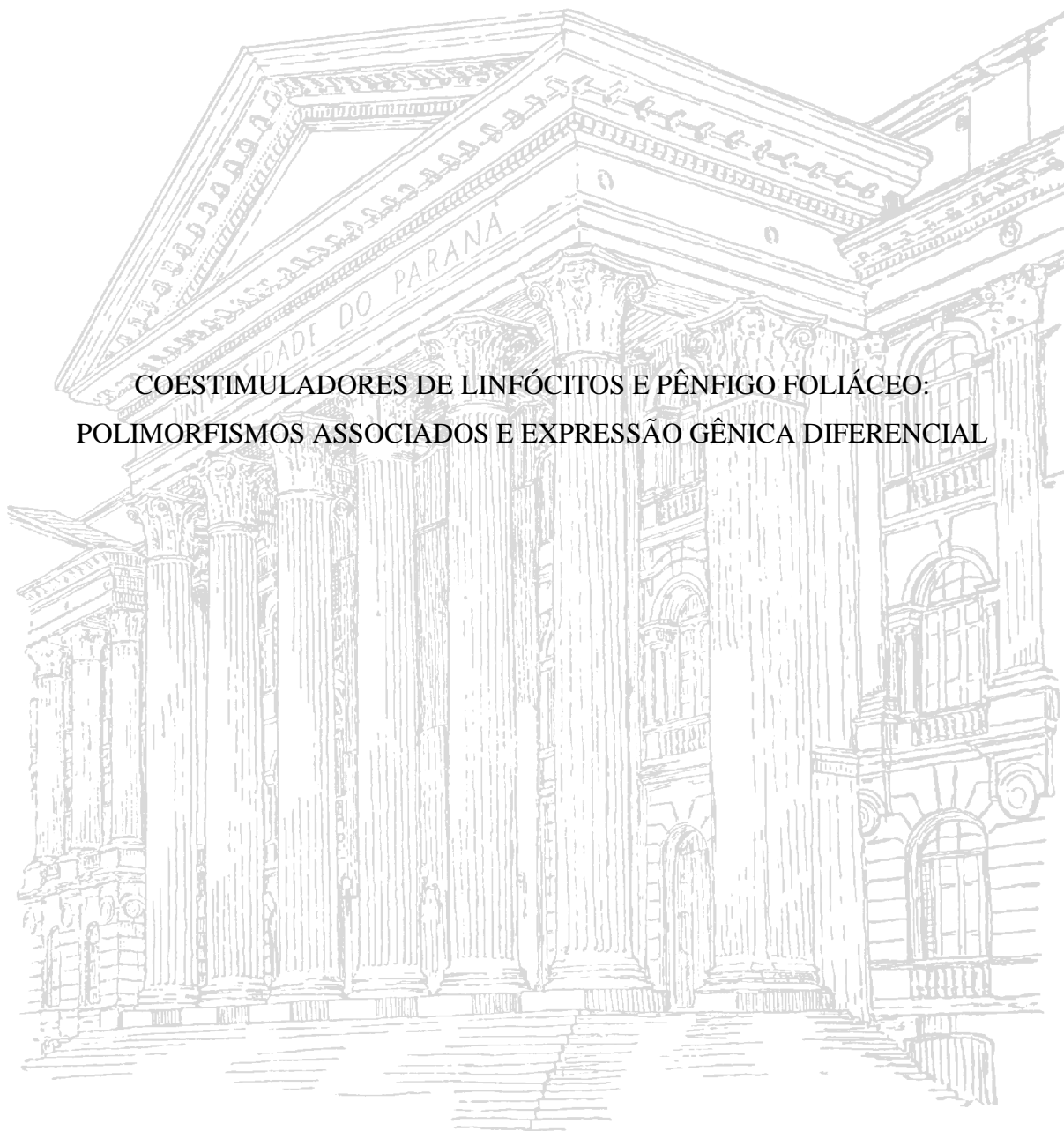


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIANA ALVES DE OLIVEIRA

COESTIMULADORES DE LINFÓCITOS E PÊNFIGO FOLIÁCEO:
POLIMORFISMOS ASSOCIADOS E EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL



CURITIBA

2015

LIANA ALVES DE OLIVEIRA

COESTIMULADORES DE LINFÓCITOS E PÊNFIGO FOLIÁCEO:
POLIMORFISMOS ASSOCIADOS E EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Tese de doutorado entregue ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-
Erlar

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Liana Alves de
Coestimuladores de linfócitos e pênfigo foliáceo: polimorfismos
associados e expressão gênica diferencial. / Liana Alves de Oliveira. –
Curitiba, 2015.
165 f. : il. color. ; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1.Penfigo. 2. Genética. I. Título II. Petzl-Erler, Maria Luiza. III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.978

PARECER

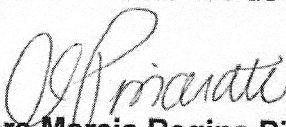
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **LIANA ALVES DE OLIVEIRA**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata. Secretária da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de julho de 2015



Doutora Mara Helena Hutz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Membro Titular



Doutora Marcia Regina Pincerati

Universidade Positivo – Membro Titular



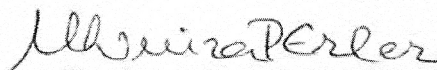
Doutora Lupe Furtado Alle

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



Doutora Danilo Gardenal Augusto

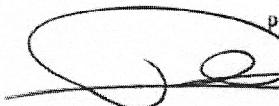
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



Doutora Maria Luiza Petzl-Erler

Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



Prof^º Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matrícula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer às pessoas que aceitaram fazer parte desta pesquisa e aos hospitais com os quais temos parceria. Mesmo que esta tese seja apenas um passo minúsculo na direção da melhora de vida dos pacientes, fico muito grata pela oportunidade de colaborar.

Gostaria de agradecer também aos membros da banca, por terem aceitado o convite, por lerem meu trabalho e pelas ótimas sugestões que com certeza virão.

Agradeço também à minha orientadora, Maria Luiza, por tantos anos de ensinamentos, pela paciência e pela compreensão nos muitos momentos difíceis que passei durante o doutorado.

Gostaria de agradecer ao apoio financeiro da CAPES, do CNPq e da Fundação Araucária, que viabilizou a realização deste trabalho.

Queria agradecer ao pessoal da UNICAMP, inclusive às professoras Dra. Anete Pereira de Souza e Dra. Edi Lúcia Sartorato, que me "emprestaram" o Sequenom, que me acolheram nos laboratórios sempre que necessário e que tentaram me ajudar. Em especial à Carol, que me deu muito apoio e muito especial à Aline, que mesmo cheia de tarefas sempre dava um jeitinho de correr minhas placas.

Agradeço também ao LIGH, em especial o Alessandro, a Sônia e a Vanessa, pelo empréstimo e dicas de uso do leitor de ELISA e o shaker.

Agradeço à Alessandra Zeizer Dimas, pelo apoio estatístico para a análise de regressão múltipla.

Agradeço aos colegas de laboratório, pelos momentos de descontração, por ouvirem tantas reclamações e pela companhia nas coletas, que nem sempre foram fáceis. Em especial à Carol, que se empenhou muito separando PBMCs, foi companheira nas qPCRs e também, assim como a Sara, nas viagens pra Campinas e na "batalha" do sequenom. Ao Gabriel, pelas madrugadas separando células, que um dia darão um lindo resultado. Ao Rodrigo, que me ajudou com a regressão logística, com minha "iniciação" no Plink no R e com as ferramentas de bioinformática.

Agradeço também aos ex-colegas de laboratório, que foram ótimos companheiros ao longo de tantos anos e que sempre que possível acabam fazendo uma

visita. Em especial à Márcia, pelas dicas com o ELISA, e ao Ric, pela ajuda com o Variant Reporter e pelas outras mil dicas que eu não parava de pedir!

Agradeço também às minhas amigas, Fat, Marjinha e Manu. Cada vez que conseguíamos nos encontrar eu renovava minhas energias e vocês me deram muita força, mesmo de longe, nos momentos mais sofridos. Amo vocês!

Quero agradecer também minha família, pelo apoio, pela força e pela paciência. Amo muito todos vocês! Um agradecimento muitíssimo especial à minha mãe, que concentrou muita energia em mim e me ajudou demais! Obrigada pelas comidinhas, pela compreensão, pelos presentinhos, pelo apoio estatístico, pelo teto sempre que preciso, pela casa, pelas caronas e por toda a preocupação e vontade infinita de me ajudar!

E deixo um agradecimento muito especial à minha querida Andy, que divide tudo comigo, inclusive o teto. Obrigada por ser a pessoa especial que você é, por sempre tentar me levantar nos momentos em que eu só queria fugir, por me alimentar muitas vezes, por me elogiar muito, por me fazer rir sempre e, claro, por ter me apresentado ao mundo dos algoritmos!!! Te amo!

RESUMO

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune da pele, caracterizada pela presença de anticorpos principalmente contra a desmogleína 1, uma molécula presente nos desmossomos. O PF ocorre de forma esporádica no mundo todo, mas é endêmico no Brasil. No PF, ocorre o rompimento da ligação entre os queratinócitos, processo conhecido por acantólise, que ocorre na camada mais superficial da epiderme, levando à formação de bolhas. Em outra forma de pênfigo, o pênfigo vulgar (PV), as bolhas ocorrem numa camada mais profunda da epiderme e também em mucosas. No presente trabalho o objetivo foi estudar a importância de variantes de genes que codificam moléculas coestimuladoras de linfócitos na susceptibilidade diferencial ao PF endêmico (PFE). Os genes em questão são *BAFF*, *APRIL*, *BAFFR*, *BCMA* e *TACI*. A molécula BAFF tem expressão elevada em diversas doenças autoimunes, inclusive no PFE. BAFF e a proteína homóloga APRIL compartilham os receptores BCMA e TACI, enquanto que BAFFR é receptor exclusivo de BAFF. Além de procurar associações de variantes destes genes com a susceptibilidade ao PFE, também investigamos sua expressão em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes de PFE, pacientes de PV e indivíduos clinicamente saudáveis. Níveis dos autoanticorpos anti-desmogleína (anti-DSG) 1 e 3 também foram verificados em pacientes de PF e de PV e em indivíduos controle. Foram genotipados 51 SNPs, dos quais quatro estão associados com a susceptibilidade diferencial ao PFE: rs11552708 (*APRIL*), rs13332630 (*BCMA*), rs12938073 (*TACI*) e rs4421862 (*BAFF*). Apenas rs11552708 já havia sido encontrado associado com outras doenças autoimunes, sendo que para os outros três esta é a primeira descrição de uma associação. A expressão dos genes em PBMC, feita por PCR quantitativa (qPCR), mostrou pequenas variações para os genes *APRIL*, *BCMA* e *BAFFR*, mas as diferenças de expressão não puderam ser explicadas pelos genótipos dos SNPs associados. Os níveis de autoanticorpos foram medidos por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) no soro de 68 pacientes de PFE, 20 pacientes de PV e 48 indivíduos controle. Como esperado, anti-DSG1 foi mais comum em PFE e anti-DSG3 mais comum em PV. Pacientes em remissão e um indivíduo controle que habitava área endêmica foram positivos, indicando que deve haver cautela na utilização destes anticorpos no diagnóstico. No presente trabalho evidenciamos a importância da variabilidade genética de coestimuladores de linfócitos na susceptibilidade ao PFE.

Palavras-chave: pênfigo foliáceo; autoimunidade; coestimuladores de linfócitos; BAFF; APRIL; BCMA; TACI; BAFFR.

ABSTRACT

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease, characterized by skin blisters caused by acantholysis, the detachment between keratinocytes. Sporadic cases of PF occur worldwide, but in Brazil PF is endemic (EPF). Patients have auto antibodies specially against desmoglein 1, a protein found in desmosomes. In PF, the blisters are found in a superficial layer of the epidermis, while in another form of pemphigus, pemphigus vulgaris (PV), blisters are found in the suprabasal layer of the epidermis, as well as in mucous membranes. In the present work, we aimed at analyzing genetic variants of genes encoding lymphocyte costimulators regarding the differential susceptibility to EPF. The chosen genes were: *BAFF*, *APRIL*, *BAFFR*, *BCMA* and *TACI*. *BAFF* expression is elevated in many autoimmune diseases, including EPF. *BAFF* and the homologous protein *APRIL* share the receptors *BCMA* and *TACI*, and *BAFFR* is an exclusive receptor for *BAFF*. Additionally to searching for association of genetic variants of these genes with EPF, their expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was analyzed in EPF and PV patients, and in clinically healthy individuals. Anti-desmoglein (anti-DSG) 1 and 3 levels were also measured in EPF and PV patients and in controls. Of the 51 SNPs genotyped, four were associated with differential susceptibility to EPF: rs11552708 (*APRIL*), rs13332630 (*BCMA*), rs12938073 (*TACI*) and rs4421862 (*BAFF*). Previous associations have been described only for rs11552708, while for the other three this is the first report of association with a disease. Small differences were observed in the expression of *APRIL*, *BCMA* and *BAFFR*, as analyzed by quantitative PCR (qPCR) in PBMC. However, the differences in the expression could not be related to the genotypes of the respective genes associated with EPF. Antibody levels were measured by ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) in the serum of 68 EPF patients, 20 PV patients and 48 controls. As expected, anti-DSG1 was more prevalent among EPF patients, while anti-DSG3 was more prevalent among PV patients. Patients under remission as well as one control individual from the endemic area were positive, indication that caution should be taken when using these antibodies for diagnosis. In the present work, we highlighted the importance of genetic variants of lymphocyte costimulators in the differential susceptibility to EPF.

Key-words: pemphigus foliaceus; autoimmunity; lymphocyte costimulators; *BAFF*; *APRIL*; *BCMA*; *TACI*; *BAFFR*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos genes BAFF, TWEAK, APRIL, BCMA, BAFFR e TACI.....	23
Figura 2. Interações entre BAFF, APRIL e seus receptores.....	24
Figura 3. Estratégias terapêuticas com moléculas bloqueadoras de BAFF ou de BAFF e APRIL.....	26
Figura 4. Conjunto de SNPs de interesse para os genes <i>APRIL</i> (<i>TNFSF13</i>) e <i>TWEAK</i> (<i>TNFSF12</i>).....	36
Figura 5. Conjunto de SNPs de interesse para o gene <i>BAFF</i> (<i>TNFSF13B</i>).	36
Figura 6. Conjunto de SNPs de interesse para o gene <i>BAFFR</i> (<i>TNFRSF13C</i>).	36
Figura 7. Conjunto de SNPs de interesse para o gene <i>BCMA</i> (<i>TNFRSF17</i>).	37
Figura 8. Conjunto de SNPs de interesse para o gene <i>TACI</i> (<i>TNFRSF13B</i>).....	37
Figura 9. Esquema da metodologia de MassARRAY®, destacando um SNP como exemplo.	40
Figura 10. Exemplo de gráfico da visualização dos genótipos gerado pelo programa TYPER® (Sequenom®).....	41
Figura 11. Frequências alélicas e valores de OR, IC e <i>P</i> para rs4421862 (<i>BAFF</i>).	60
Figura 12. Frequências alélicas e valores de OR, IC e <i>P</i> para rs13332630 (<i>BCMA</i>).	63
Figura 13. Frequências alélicas e valores de OR, IC e <i>P</i> para rs11552708 (<i>APRIL</i>).	68
Figura 14. Frequências alélicas e valores de OR, IC e <i>P</i> para rs12938073 (<i>TACI</i>).	74
Figura 15. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 em população europeia, numa região de 500kb.....	91
Figura 16. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 em população africana, numa região de 500kb.....	92
Figura 17. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 em população europeia, numa região de 25kb.....	92
Figura 18. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 em população africana, numa região de 25kb.....	93
Figura 19. Frequências do SNP rs73611008 em diferentes populações.....	93
Figura 20. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs4421862	94

Figura 21. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs73611008	95
Figura 22. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs13332630	96
Figura 23. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs11552708	97
Figura 24. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs12938073	98
Figura 25. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 em controles e pacientes.	105
Figura 26. Análise de resíduos do modelo de regressão múltipla feito para a quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 utilizando como variáveis explicativas a idade e o subgrupo dos indivíduos.	107
Figura 27. Comparações múltiplas das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 (U/mL) entre os diferentes subgrupos.	107
Figura 28. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados de acordo com gravidade das lesões ou tempo sem apresentar lesões....	109
Figura 29. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 3 em controles e pacientes.	111
Figura 30. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados quanto à dose de tratamento imunossupressor.	112
Figura 31. <i>Fold change</i> (em escala logarítmica) da expressão de mRNA em PBMC nos diferentes subgrupos de pacientes e em indivíduos controle.....	114
Figura 32. <i>Fold change</i> (em escala logarítmica) da expressão de mRNA em PBMC em pacientes de pênfigo foliáceo positivos ou negativos para anti-desmogleína 1.	115
Figura 33. <i>Fold change</i> (em escala logarítmica) da expressão de mRNA em PBMC de acordo com genótipos nos respectivos genes.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Designações dos genes do presente estudo.....	22
Tabela 2. Descrição da amostra do estudo de associação.....	31
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> desenhados para amplificação e sequenciamento....	33
Tabela 4. Localização dos 52 SNPs selecionados para genotipagem e conjuntos de SNPs em cada ensaio multiplex utilizado para a genotipagem.	38
Tabela 5. Descrição dos indivíduos que compõe a amostra utilizada para análise de expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico (PBMC).	49
Tabela 6. Valores de <i>P</i> para comparações entre frequências alélicas de subgrupos amostrais.....	52
Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e <i>P</i> para SNPs do gene <i>BAFF</i>	55
Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e <i>P</i> para SNPs do gene <i>BCMA</i>	61
Tabela 9. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e <i>P</i> para SNPs dos genes <i>TWEAK</i> e <i>APRIL</i>	64
Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e <i>P</i> para SNPs do gene <i>TACI</i>	69
Tabela 11. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e <i>P</i> para SNPs do gene <i>BAFFR</i>	75
Tabela 12. Resultado da análise de regressão logística incluindo os genótipos dos SNPs associados, sexo, etnia, ocupação, escolaridade e local de residência.	78
Tabela 13. Comparações de frequências genotípicas e frequências de heterozigotos com homozigotos, com valores de OR, IC e <i>P</i> , para SNPs do gene <i>BAFF</i>	79
Tabela 14. Frequências haplotípicas, valores de OR, IC e <i>P</i> para haplótipos de SNPs dos genes <i>BAFF</i> , <i>BCMA</i> , <i>TWEAK</i> , <i>APRIL</i> e <i>TACI</i>	80
Tabela 15. Análise de interação entre rs4421862 (<i>BAFF</i>) e rs1332630 (<i>BCMA</i>).	84
Tabela 16. Análise de interação entre rs4421862 (<i>BAFF</i>) e rs11552708 (<i>APRIL</i>).	85
Tabela 17. Análise de interação entre rs4421862 (<i>BAFF</i>) e rs12938073 (<i>TACI</i>).	86
Tabela 18. Análise de interação entre rs1332630 (<i>BCMA</i>) e rs11552708 (<i>APRIL</i>).	87
Tabela 19. Análise de interação entre rs1332630 (<i>BCMA</i>) e rs12938073 (<i>TACI</i>).	88

Tabela 20. Análise de interação entre rs11552708 (<i>APRIL</i>) e rs12938073 (<i>TACI</i>).	89
Tabela 21. Quantificações dos autoanticorpos no soro de pacientes e de indivíduos controle.	100
Tabela 22. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 em controles e subgrupos de pacientes.	104
Tabela 23. Valores de <i>P</i> nas comparações de níveis de anticorpo anti-desmogleína 1 entre controles e subgrupos de pacientes pelo teste de Mann-Whitney.	105
Tabela 24. Resultado da análise de regressão múltipla feita para a quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 utilizando como variáveis explicativas a idade e o subgrupo dos indivíduos.	106
Tabela 25. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados de acordo com gravidade das lesões ou tempo sem apresentar lesões.	108
Tabela 26. Valores de <i>P</i> na comparação de níveis de anticorpo anti-desmogleína 1 entre subgrupos de pacientes classificados quanto à gravidade das lesões e tempo sem apresentar novas lesões pelo teste de Mann-Whitney.	109
Tabela 27. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 3 em controles e subgrupos de pacientes.	110
Tabela 28. Valores de <i>P</i> nas comparações de níveis de anticorpo anti-desmogleína 3 entre controles e subgrupos de pacientes.	111
Tabela 29. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados quanto à dose de tratamento imunossupressor.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APRIL	- <i>A Proliferation-Inducing Ligand</i>
BAFF	- <i>B-cell Activating Factor</i>
BAFFR	- <i>B-cell Activating Factor Receptor</i>
BCMA	- <i>B-cell Maturation Factor</i>
BLyS	- <i>B Lymphocyte Stimulator</i>
C	- Amostra de indivíduos saudáveis (controles)
CBMEG	- Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
cDNA	- DNA complementar
CD40L	- <i>CD40 Ligand</i>
CE	- Indivíduos controle de área endêmica
Cq	- <i>Quantification Cycle</i>
CRD	- <i>Cysteine-Rich Domain</i>
CTLA4	- <i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated 4</i>
CVID	- <i>Common variable immunodeficiency</i>
CWB	- Amostra de indivíduos da população de Curitiba e região metropolitana
dbSNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DNA	- <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ddNTP	- <i>Dideoxynucleotide Triphosphates</i>
DL	- Desequilíbrio de Ligação
dNTP	- <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DSG	- Desmogleína
EC	- Extracelular
EDTA	- <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EST	- <i>Expressed Sequence Tag</i>
EU	- Amostra de indivíduos com origem étnica predominantemente europeia
FMRP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP
GBS	- <i>Glycosaminoglycan-Binding Sequence</i>
HAP	- Hospital Adventista do Pênfigo

HC	- Hospital de Clínicas da UFPR
HFSU	- Lar da Caridade Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HW	- Hardy-Weinberg
IC	- Intervalo de Confiança
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
kb	- kilo pares de bases
LES	- Lupus Eritematoso Sistêmico
LGMH	- Laboratório de Genética Molecular Humana
M	- Amostra de indivíduos de origem étnica mestiça europeia e africana
MALDI-TOF	- <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
mRNA	- RNA mensageiro
MS	- Mato Grosso do Sul
MZF1	- <i>Myeloid Zinc Finger Gene 1</i>
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFKB	- <i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NZ	- Nova Zelândia
OR	- <i>Odds Ratio</i>
P	- Amostra de pacientes de PFE
pb	- pares de base
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
aPFCT	- Pacientes de PF com doença ativa e sob tratamento imunossupressor
aPFST	- Pacientes de PF com doença ativa e sem tratamento imunossupressor
aPV	- Pacientes de PV com doença ativa
iPFCT	- Pacientes de PF com doença inativa e sob tratamento imunossupressor
iPFST	- Pacientes de PF com doença inativa e sem tratamento imunossupressor
iPV	- Pacientes de PV com doença inativa
PBMC	- <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PF	- Pênfigo Foliáceo
PFCLCT	- Pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor
PFCLST	- Pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor

PFE	- Pênfigo Foliáceo Endêmico
PFSLCT	- Pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor
PFSLST	- Pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor
PV	- Pênfigo Vulgar
qPCR	- PCR quantitativo
RNA	- <i>Ribonucleic Acid</i>
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SS	- Síndrome de Sjögren
TACI	- <i>Transmembrane Activator and CAML Interactor</i>
TALL1	- <i>TNF- and ApoL-Related Leukocyte Expressed Ligand 1</i>
TALL2	- <i>TNF- and ApoL-Related Leukocyte Expressed Ligand 2</i>
THANK	- <i>TNF Homolog That Activates Apoptosis, NFkB, and JNK</i>
THD	- <i>TNF Homology Domain</i>
TMD	- <i>Transmembrane Domain</i>
TNF	- <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFRSF13B	- <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 13b</i>
TNFRSF13C	- <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 13c</i>
TNFRSF17	- <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 17</i>
TNFSF12	- <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily, member 12</i>
TNFSF13	- <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily, member 13</i>
TNFSF13B	- <i>Tumor Necrosis Factor Superfamily, member 13b</i>
TRAF	- <i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
TWEAK	- <i>TNF-Related Weak Inducer of Apoptosis</i>
TWE-PRIL	- <i>TWEAK/APRIL</i>
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
USP	- Universidade de São Paulo
UTR	- <i>Untranslated Region</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO	18
2.2 BAFF, APRIL E SEUS RECEPTORES	21
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO CASO-CONTROLE.....	30
4.1.1 Amostra populacional	30
4.1.2 Seleção de marcadores para estudo de associação	32
4.1.3 Genotipagem dos marcadores	39
4.1.4 Análise estatística do estudo de associação	41
4.1.5 Análises adicionais com ferramentas de bioinformática.....	44
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS NO SORO	45
4.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE mRNA EM PBMC	47
5. RESULTADOS	51
5.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO CASO-CONTROLE.....	51
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS NO SORO	99
5.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE mRNA EM PBMC	113
6. DISCUSSÃO	117
6.1 ALELOS DE <i>BAFF</i> , <i>APRIL</i> , <i>BCMA</i> e <i>TACI</i> ESTÃO ASSOCIADOS COM A SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL AO PFE	117
6.2 NÍVEIS DE mRNA DE <i>BAFF</i> , <i>APRIL</i> E SEUS RECEPTORES EM PBMC DE PACIENTES DE PÊNFIGO E CONTROLES	125
6.3 NÍVEIS DE AUTOANTICORPOS NO SORO DE PACIENTES DE PÊNFIGO E DE CONTROLES	128
7. CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS	134
ANEXO I	148

1. INTRODUÇÃO

O pênfigo consiste em um grupo de doenças autoimunes bolhosas da pele. Uma de suas principais formas, o pênfigo foliáceo (PF), caracteriza-se pela formação de bolhas na camada superficial da epiderme, decorrente da perda de adesão entre os queratinócitos, chamada de acantólise. No PF há formação de autoanticorpos contra a desmogleína (DSG) 1, molécula constituinte dos desmossomos, importante no processo de adesão celular.

O PF ocorre de forma endêmica no Brasil, sendo também conhecido como fogo selvagem. A etiologia do PF ainda é pouco conhecida. Sabe-se que é uma doença de patogênese complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais. Os principais genes conhecidamente associados ao PF são os genes *HLA* de classe II, mas outros genes já foram avaliados e outras associações foram encontradas.

Recentemente foi descrita uma associação com os genes *BAFF* (também conhecido por *BLYS* ou *TNFSF13B*) e *CD40L* (também conhecido como *CD154*), que codificam moléculas coestimuladoras de células B, que aumentam sua sobrevivência e estimulam sua diferenciação e proliferação. As células B são as responsáveis pela produção de anticorpos, inclusive dos autoanticorpos do PF. Uma alteração na resposta imune desenvolvida pelas células B pode ser um fator determinante no desenvolvimento de doenças autoimunes. Em um estudo do nosso grupo, foi observada uma quantidade aumentada de RNA mensageiro do gene *BAFF* em células T $CD4^+$ isoladas de pacientes com a forma generalizada do PF em relação a indivíduos sem a doença. Foi observado também que este gene encontra-se menos expresso em pacientes sob tratamento quando comparado a pacientes não tratados.

Camundongos que apresentam altas quantidades do estimulador de linfócito B (BAFF) desenvolvem uma doença autoimune semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, pacientes de algumas doenças autoimunes (como o lúpus e artrite reumatoide) têm uma maior quantidade de BAFF no soro quando comparados a pessoas saudáveis. Por isso, anticorpos anti-BAFF estão sendo testados como terapia para o tratamento de algumas doenças autoimunes.

BAFF possui três receptores: TACI, BAFFR e BCMA. Outra proteína relacionada a BAFF, APRIL (produto do gene *TNFSF13*), também liga dois destes receptores, sendo que apenas BAFFR é exclusivo para BAFF. As funções de cada uma

destas proteínas ainda não estão completamente esclarecidas, mas sabe-se que ambos BAFF e APRIL são importantes estimuladores de células B.

Para entender melhor a contribuição de BAFF, de seus receptores e de moléculas relacionadas na etiologia do PF, no presente trabalho ampliamos o estudo de associação realizado anteriormente, incluindo um maior número de marcadores do gene *BAFF* e incluindo marcadores dos genes *APRIL*, *TACI*, *BAFFR* e *BCMA*. Além disso, nesse trabalho também avaliamos a expressão desses genes em células de pacientes de PF e de indivíduos sem a doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PÊNFIGO FOLIÁCEO

Pênfigo denomina um grupo de doenças autoimunes bolhosas da pele. Das diferentes formas de pênfigo as principais são o pênfigo foliáceo (PF) e o pênfigo vulgar (PV). Estas doenças caracterizam-se pela formação de autoanticorpos contra proteínas do desmossomo (JONES *et al.*, 1984), estrutura importante para a adesão celular. Como consequência, ocorre o desprendimento das células da epiderme, processo chamado de acantólise.

As proteínas dos desmossomos que são alvo dos autoanticorpos de PF e PV são principalmente as desmogleínas (AMAGAI *et al.*, 1995). No PF, o alvo principal é a desmogleína (DSG) 1, que é mais encontrada na camada superficial da epiderme. Por isso, as lesões do PF são lesões superficiais na pele. Já no PV, os autoanticorpos são contra DSG3 e muitas vezes também contra DSG1 (EYRE e STANLEY, 1988). A DSG3 ocorre em maior quantidade nas camadas mais basais da epiderme, assim como nas mucosas, sendo o PV caracterizado por lesões mais profundas (AMAGAI *et al.*, 1996). Apesar desta diferenciação, sabe-se que pacientes de PF podem apresentar autoanticorpos contra DSG3 (ARTEAGA *et al.*, 2002). Além disso, tanto no PF quanto no PV pode haver autoanticorpos contra outras proteínas, como, por exemplo, E-caderina (EVANGELISTA *et al.*, 2008; KALANTARI-DEHAGHI *et al.*, 2013).

O PF ocorre de forma esporádica no mundo, porém, no Brasil ele é endêmico, principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, sendo também conhecido como fogo selvagem (DIAZ *et al.*, 1989). A doença afeta principalmente pessoas que moram em áreas rurais, nas proximidades de cursos de água. O número de casos em alguns estados diminuiu nos últimos anos enquanto em outros estados têm aumentado, havendo uma ocorrência maior em locais que estão sendo ocupados e uma diminuição da ocorrência quando o local passa a ser mais urbanizado (DIAZ *et al.*, 1989). Foi observada, por exemplo, uma diminuição recente da incidência de PF no estado de São Paulo (GONÇALVES *et al.*, 2011).

O PF endêmico (PFE) do Brasil é clinicamente e histopatologicamente idêntico ao PF esporádico (STANLEY *et al.*, 1986), diferindo apenas em sua epidemiologia. No Brasil, a prevalência pode ser tão alta quanto 3,4%, nos índios Terena da reserva de

Limão Verde (WARREN *et al.*, 2000). O PFE ocorre principalmente em jovens adultos com proporção sexual de 1:1 (AOKI *et al.*, 2004). Na França, o PF tem incidência de 0,5 casos por milhão de habitantes por ano (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1995). Formas endêmicas de PF foram observadas também na Tunísia e na Colômbia. Na Tunísia, a doença tem incidência de 3,9 casos por milhão de habitantes por ano e atinge principalmente mulheres de 25 a 34 anos de idade, sendo que a proporção sexual se considerados todos os tipos de pênfigo é de 4:1 (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1995). Já na Colômbia, o PF afeta principalmente homens acima de 40 anos e possui algumas características diferentes, como alguns autoantígenos (HISAMATSU *et al.*, 2003).

A endemicidade e outras características epidemiológicas do PFE no Brasil sugerem a existência de um fator ambiental nas regiões endêmicas. Um dos possíveis fatores seria a picada de mosquitos da família simuliidae (LOMBARDI *et al.*, 1992). Foi verificado que os focos com maior ocorrência da doença coincidem com áreas com predominância de insetos da espécie *Simulium nigrimanum* (EATON *et al.*, 1998). Outro fator que parece aumentar o risco de desenvolver a doença é o tipo de moradia dos indivíduos, sendo que casas rústicas com telhado de palha e sem porta parecem caracterizar muitos dos casos observados na reserva de Limão Verde (AOKI *et al.*, 2004). Uma hipótese possível seria que algum antígeno da saliva deste ou de outros mosquitos hematófagos possam ter resposta cruzada com a DSG1, o que desencadearia a doença em indivíduos geneticamente susceptíveis (FLORES *et al.*, 2009). Recentemente foi visto que anticorpos de pacientes de PFE reconhecem uma proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*, mosquito vetor da leishmaniose (QIAN *et al.*, 2012), fortalecendo esta hipótese.

Outra evidência que aponta para existência de um fator ambiental de risco para o PFE no Brasil é o fato de habitantes de áreas endêmicas que não apresentam a doença possuírem anticorpos anti-DSG1 (WARREN *et al.*, 2000). Estes anticorpos reconhecem uma porção distinta da molécula da DSG1 em relação aos anticorpos patogênicos encontrados nos pacientes (LI *et al.*, 2003). A desmogleína possui cinco domínios extracelulares (EC1-EC5). Um modelo propõe que indivíduos da área endêmica produzam primeiramente anticorpos contra o domínio EC5, que seriam principalmente da subclasse IgG1 e não patogênicos. Posteriormente, indivíduos geneticamente susceptíveis desenvolveriam anticorpos patogênicos contra os domínios EC1 e/ou EC2

da DSG1, por um processo conhecido como espalhamento de epítopo, resultando no processo de acantólise e quadro clínico de PF (LI *et al.*, 2003).

A existência de um componente genético de susceptibilidade ao PF foi observada pela ocorrência de agregação familiar e, desde 1989, pela identificação de genes associados à susceptibilidade diferencial ao PFE (DIAZ *et al.*, 1989; PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989). Além da associação com genes *HLA* de classe II, que foi a primeira descrita e a mais estudada (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; MORAES *et al.*, 1997; PAVONI *et al.*, 2003), outros genes também foram analisados quanto à susceptibilidade ao PF. Um gene que codifica uma proteína reguladora da expressão de genes *HLA* de classe II, *CIITA*, mostrou-se associado ao PFE, inclusive mostrando uma interação com o genótipos *HLA-DRB1* na susceptibilidade ao PFE (PIOVEZAN e PETZL-ERLER, 2013).

Além disso, foram observadas associações com genes para citocinas, IL-4 e IL-6 (PEREIRA *et al.*, 2004), uma molécula envolvida na manutenção da tolerância periférica, PD-1 (BRAUN-PRADO e PETZL-ERLER, 2007), moléculas coestimuladoras de linfócitos T, CD86 e CTLA4 (DALLA-COSTA *et al.*, 2010), moléculas coestimuladoras de células B, CD40, CD40L e BLyS (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009) e genes *KIR* (AUGUSTO *et al.*, 2012). No caso de genes *KIR*, é interessante destacar que foi observado um efeito protetor de genes *KIR* ativadores, inclusive observando-se uma associação negativa para a ocorrência simultânea do gene ativador *KIR3DS1* e de alelos codificando seu ligante, HLA-Bw4. Isto é interessante, pois para várias outras doenças autoimunes, a presença de genes *KIR* ativadores foi um fator de susceptibilidade e não proteção (AUGUSTO *et al.*, 2012). Genes para outras moléculas do sistema imune, assim como o gene para a DSG1, foram estudados, mas nenhuma associação foi observada (ROXO *et al.*, 2003; PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005; KÖHLER e PETZL-ERLER, 2006; PAVONI *et al.*, 2006; PINCERATI *et al.*, 2010).

A expressão gênica global também já foi avaliada em células T CD4⁺ de pacientes de PFE. Foram analisados subgrupos de pacientes com a forma generalizada da doença e sem tratamento imunossupressor, pacientes sob tratamento imunossupressor e pacientes com a forma localizada da doença. A comparação da expressão gênica destes subgrupos com o perfil de expressão de indivíduos saudáveis, mostrou 135, 54 e 64 genes diferencialmente expressos, respectivamente. Os genes

diferencialmente expressos foram na sua maioria genes relacionados a adesão e migração de linfócitos, apoptose, proliferação celular, citotoxicidade e apresentação de antígenos (MALHEIROS *et al.*, 2014).

2.2 BAFF, APRIL E SEUS RECEPTORES

O fator de ativação de células B (BAFF) é uma molécula da família de ligantes TNF. É também conhecido como estimulador de células B (BLyS), ou TNFSF13B (Tabela 1). É uma citocina coestimuladora de células B, expressa por diversas células do sistema imune, principalmente células apresentadoras de antígeno (MOORE *et al.*, 1999; MUKHOPADHYAY *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 1999; SHU *et al.*, 1999; TRIBOULEY *et al.*, 1999). BAFF interage com receptores na superfície da célula B estimulando sua sobrevivência e proliferação (MOORE *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 1999; MACKAY *et al.*, 2010). BAFF pode ser expresso ligado à membrana ou ser secretado na sua forma solúvel, após clivagem por proteínas da família das furinas (SCHNEIDER *et al.*, 1999). A forma ativa da molécula é um homotrímero, mas também já foi observado um 60-mero, com estrutura similar a um vírus, que foi capaz de estimular a via de NF- κ B (LIU *et al.*, 2002). Foi alegado que este multímero poderia ser apenas artefato da preparação da amostra (ZHUKOVSKY *et al.*, 2004).

APRIL, ou TNFSF13 (Tabela 1), é um ligante indutor de proliferação que tem alta identidade de sequência com BAFF (HAHNE *et al.*, 1998; MOORE *et al.*, 1999). O papel biológico de APRIL é menos definido que o de BAFF, mas sabe-se que ele está envolvido na indução e manutenção das respostas imunes de células B e T (STEIN *et al.*, 2002). APRIL é processado no complexo de Golgi e é secretado e, assim como BAFF, ocorre como um trímero (LÓPEZ-FRAGA *et al.*, 2001). Pode ser formado também um heterotrímero funcional de BAFF e APRIL, que foi observado em pacientes de doenças reumáticas imunes e de lúpus eritematoso sistêmico (ROSCHKE *et al.*, 2002; DILLON *et al.*, 2010).

Foi descrito um transcrito híbrido que codifica uma proteína que contém o domínio carboxi-terminal de APRIL fusionado com os domínios transmembrana e intracelular de outra proteína da família TNF, TWEAK (TNFSF12), cujo gene está mapeado a menos de 1.000 pares de base de *APRIL* (Figura 1). O transcrito é traduzido e a proteína resultante, chamada TWE-PRIL, é biologicamente ativa (PRADET-

BALADE *et al.*, 2002). Acredita-se que TWE-PRIL e APRIL tenham funções distintas, sendo que TWE-PRIL poderia funcionar como APRIL de membrana, porém, poucos estudos certificam-se sobre qual destas proteínas realmente estão sendo avaliada (PRADET-BALADE *et al.*, 2002; DARIDON *et al.*, 2008).

Foram descritos três receptores que ligam BAFF: BAFFR, BCMA e TACI (Tabela 1, Figura 1). BAFFR é receptor exclusivo de BAFF (THOMPSON *et al.*, 2001; YAN *et al.*, 2001), mas BCMA e TACI ligam também APRIL (Figura 2), sendo que BCMA tem maior afinidade por APRIL do que por BAFF (PATEL *et al.*, 2004). APRIL também liga-se a proteoglicanas (INGOLD *et al.*, 2005), permitindo seu acúmulo (SCHWALLER *et al.*, 2007; HUARD *et al.*, 2008).

Tabela 1. Designações dos genes do presente estudo.

Nome utilizado no texto	Outros nomes
<i>BAFF</i>	<i>TNFSF13B</i> , <i>BLYS</i> , <i>TALL1</i> e <i>THANK</i>
<i>APRIL</i>	<i>TNFSF13</i> , <i>TALL2</i>
<i>BAFFR</i>	<i>TNFRSF13C</i> , <i>BR3</i>
<i>BCMA</i>	<i>TNFRSF17</i>
<i>TACI</i>	<i>TNFRSF13B</i>

O gene *BAFF* localiza-se em 13q32-q34 (MOORE *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 1999) e contém 6 éxons (Figura 1). O primeiro éxon codifica para o domínio transmembrana, o segundo para o sítio de processamento por furina e os éxons 3 a 6 codificam para o domínio de homologia a TNF, que é o domínio que interage com o receptor (BOSSSEN e SCHNEIDER, 2006). O processamento alternativo, ou *splicing* alternativo, do RNA codificado por *BAFF* gera uma variante sem o éxon 3, chamada de Δ BAFF (Figura 1), que provavelmente funciona como um inibidor de BAFF (GAVIN *et al.*, 2003), pela formação de heterotrímeros ou pela ocupação do sítio de ligação nos receptores, sem desencadear a devida resposta.

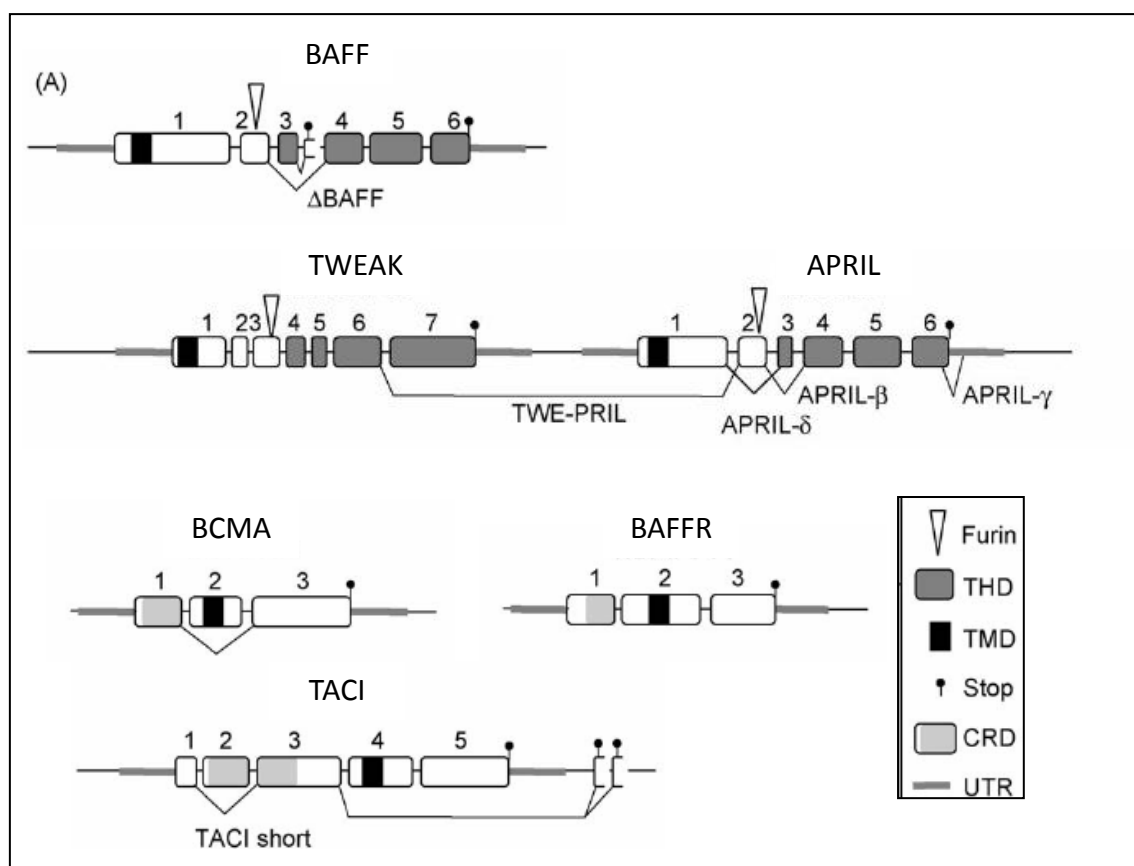


Figura 1. Estrutura dos genes *BAFF*, *TWEAK*, *APRIL*, *BCMA*, *BAFFR* e *TACI*. As caixas representam os éxons e estão em escala. Os íntrons (linhas finas) e regiões não traduzidas (linhas grossas) não estão em escala. Variantes de *splicing* são mostradas. Furin: sequência que codifica para sítio consenso de processamento por furina (R-X-R/K-R). THD: *TNF* *homology domain* – domínio de homologia ao TNF. TMD: domínio transmembrana. Stop: códon de término de tradução. CRD: *cysteine-rich domain* – domínio rico em cisteína (domínio de interação com ligante). UTR: regiões 3' e 5' não traduzidas. FIGURA ADAPTADA DE BOSSEN e SCHNEIDER, 2006.

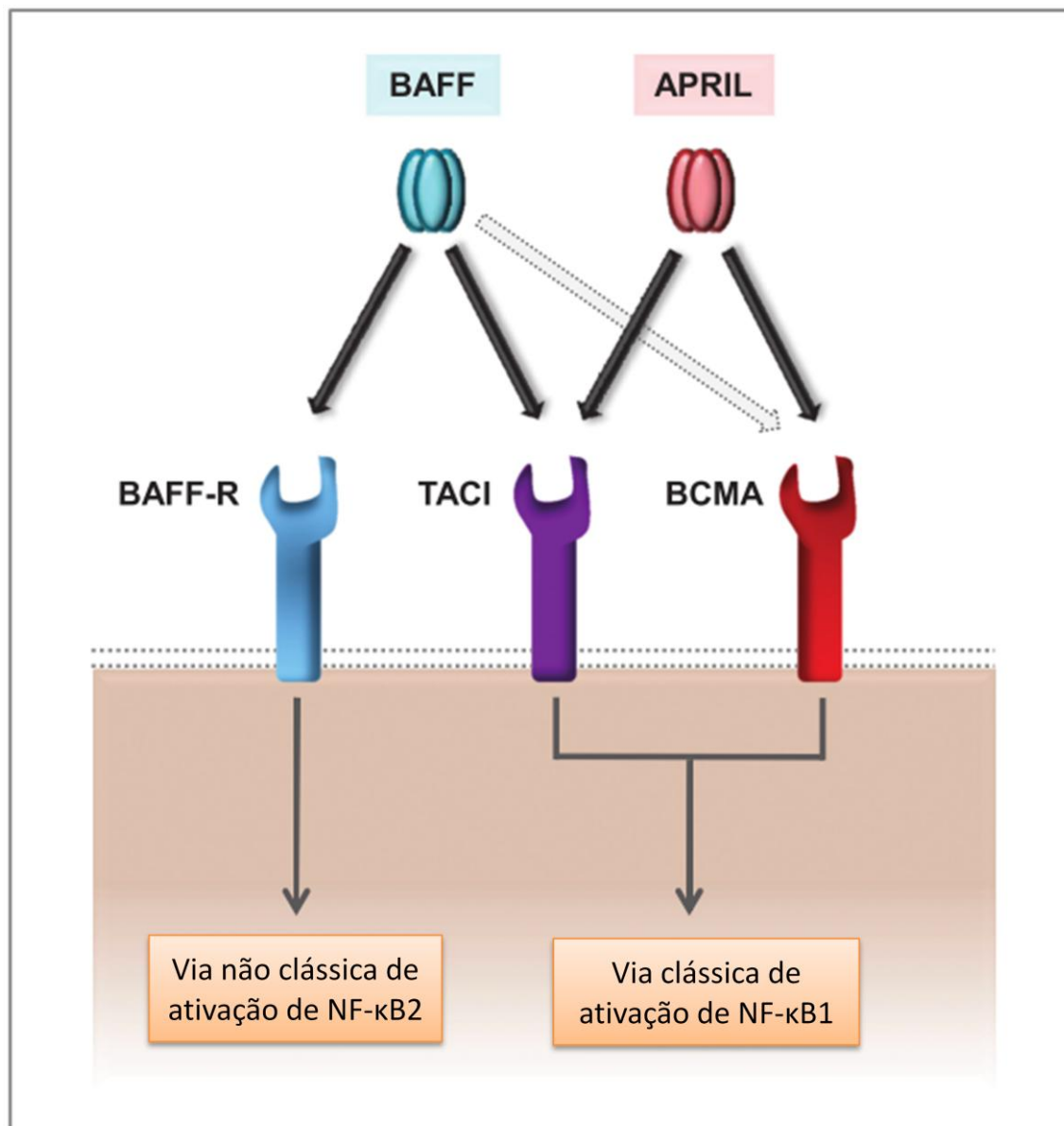


Figura 2. Interações entre BAFF, APRIL e seus receptores. Flechas escuras representam interações de alta afinidade, flechas pontilhadas representam interações de afinidade mais baixa. FIGURA ADAPTADA DE (CHHABRA *et al.*, 2013).

O gene *APRIL* está localizado em 17p13.3 (PRADET-BALADE *et al.*, 2002) e tem estrutura similar ao *BAFF* (Figura 1), porém, possui resíduos no éxon 3, próximos ao sítio de clivagem por furina, que são essenciais para ligação com proteoglicanas (INGOLD *et al.*, 2005). Algumas variantes de *splicing* raras são conhecidas para *APRIL* (Figura 1). *APRIL-δ* é caracterizado por unir éxon 1 com éxon 3 e formar uma proteína de membrana que não é clivada e não liga glicosaminoglicanos. *APRIL-β*, por sua vez, caracteriza-se por excluir o éxon 3 e é homóloga ao Δ BAFF. Já *APRIL-γ* é caracterizado pela retirada de um íntron críptico no éxon 6, gerando uma região carboxi-terminal truncada (BOSEN e SCHNEIDER, 2006).

O gene *BAFFR* está localizado em 22q13 (THOMPSON *et al.*, 2001) e tem 3 éxons (Figura 1). O éxon 1 codifica para o domínio rico em cisteína, que é o domínio de interação com o ligante. O éxon 2 codifica para a região transmembrana e o éxon 3 para o domínio intracelular. O domínio intracelular tem um segmento com altíssima identidade de sequência com a mesma região no gene *BCMA*, consistindo em uma sequência de 18 aminoácidos que liga TRAF (BOSEN e SCHNEIDER, 2006).

O gene *BCMA* tem estrutura (Figura 1) muito similar ao gene *BAFFR* (LAABI *et al.*, 1994) e está no cromossomo 16p13.1 (LAABI *et al.*, 1992). Uma variante de *splicing* de *BCMA* omite o éxon 2, resultando numa proteína que seria solúvel, mas não deve ser secretada pois *BCMA* não possui peptídeo sinal (BOSEN e SCHNEIDER, 2006). De qualquer forma, uma forma solúvel de *BCMA* é liberada após clivagem com γ -secretase (LAURENT *et al.*, 2015).

O gene *TACI* está localizado em 17p11.2 (VON BÜLOW *et al.*, 2000) e possui 5 éxons (Figura 1). O maior número de éxons em relação a *BAFFR* e *BCMA* reflete uma duplicação do domínio de interação com o ligante que é observada em *TACI*. A afinidade pelo ligante é muito maior no segundo domínio, permitindo a ocorrência frequente de uma variante de *splicing* que exclui o éxon 2, originando uma proteína com apenas o segundo domínio de interação com o ligante. Esta forma curta de *TACI* liga *BAFF* e *APRIL* com a mesma afinidade que a forma longa (BOSEN e SCHNEIDER, 2006).

Várias evidências sugerem o envolvimento de *BAFF* na autoimunidade. Um camundongo transgênico que expressa *BAFF* em grandes quantidades desenvolve uma doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico (GROSS *et al.*, 2000). Sugere-se que *BAFF* tenha um papel importante na manutenção da tolerância periférica e na

sobrevivência de células B autoreativas (OROPALLO *et al.*, 2011). Além disso, quantidades aumentadas de BAFF foram observadas no soro de pacientes com doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, penfigóide bolhoso e púrpura trombocitopênica idiopática (CHEEMA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001; GROOM *et al.*, 2002; ASASHIMA *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2010). Moléculas que inibem BAFF refletem em melhora nos sintomas em modelos *in vitro* e *in vivo* (GROSS *et al.*, 2001; SEYLER *et al.*, 2005; KWAN LAM *et al.*, 2008), sendo que existem estratégias terapêuticas para bloquear somente BAFF ou BAFF e APRIL simultaneamente (Figura 3). Em função disso, BAFF é um interessante alvo terapêutico e drogas que visam sua inibição já foram desenvolvidas e testadas em diversas doenças autoimunes (RICHEZ *et al.*, 2014; JORDAN e D'CRUZ, 2015; SADA *et al.*, 2015; SMOLEN *et al.*, 2015).

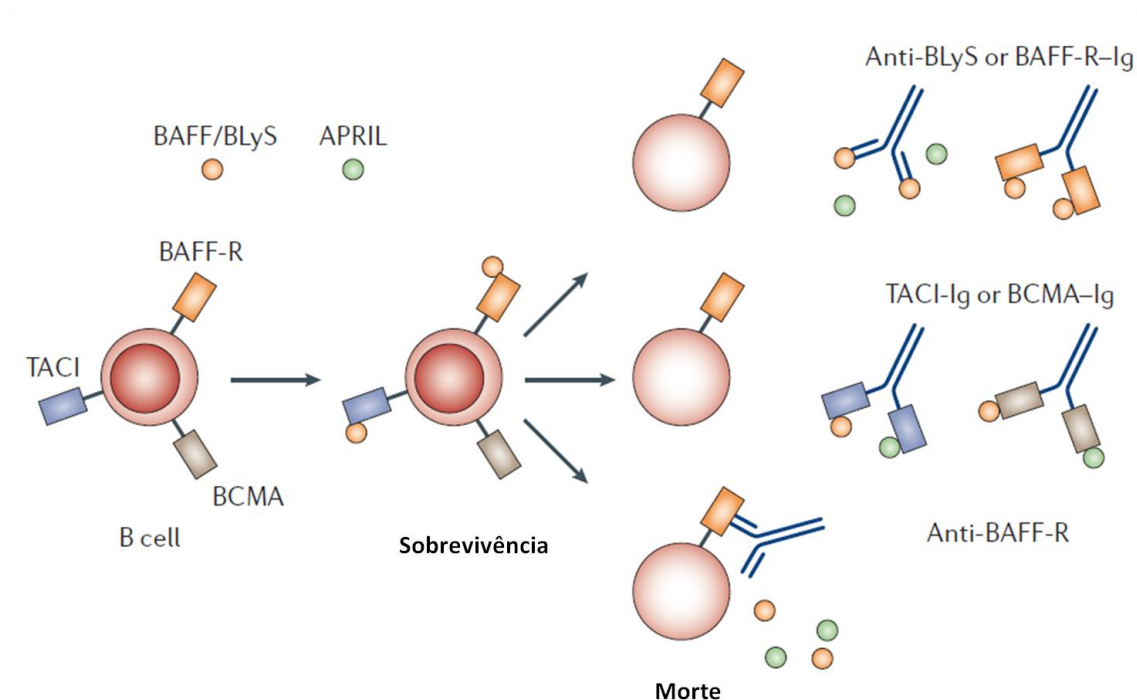


Figura 3. Estratégias terapêuticas com moléculas bloqueadoras de BAFF ou de BAFF e APRIL. É possível bloquear apenas BAFF com anticorpo anti-BAFF ou com uma fusão do receptor BAFF-R a uma imunoglobulina (Ig); fusões de TACI ou BCMA à imunoglobulinas bloqueiam ambos BAFF e APRIL; também é possível bloquear o receptor BAFF-R utilizando um anticorpo contra esta molécula. FIGURA ADAPTADA DE (BROWNING, 2006).

Polimorfismos do gene *BAFF* foram investigados quanto a sua associação com diversas doenças. Por exemplo, em um estudo na França, foi feito o sequenciamento de todo o gene *BAFF* em uma amostra de 26 indivíduos, incluindo 13 pacientes com síndrome de Sjögren (SS) e 13 indivíduos controle. O único SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) polimórfico observado foi na região promotora do gene (rs9514828), na posição -871. Este SNP foi então genotipado em 162 pacientes e 90 controles e avaliado quanto à susceptibilidade a SS, mas nenhuma associação foi observada (GOTTENBERG *et al.*, 2006). Apesar da ausência de associação, foi observado que pacientes com o alelo T tinham maior quantidade de BAFF no soro. Este mesmo SNP de *BAFF*, juntamente com outros três polimorfismos da região promotora, foram avaliados em pacientes australianos com SS e indivíduos controle, observando-se que um haplótipo da região promotora estava associado com indivíduos positivos para os autoanticorpos de SS e outro associado com os níveis de BAFF no soro destes indivíduos (NOSSENT *et al.*, 2008). Os dois haplótipos citados incluíam o alelo T do SNP -871, porém este SNP não se encontrava associado quando avaliado de forma independente. Três destes quatro polimorfismos estudados para SS foram avaliados quanto à susceptibilidade a púrpura trombocitopênica idiopática, sendo que o SNP -871 está fortemente associado, com o alelo T conferindo maior susceptibilidade (ABDELHAMID e AL-LITHY, 2011). O SNP -871 também foi avaliado quanto a susceptibilidade a artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, mas não foi observada associação (KAWASAKI *et al.*, 2002; GOTTENBERG *et al.*, 2009).

Este polimorfismo na região promotora do gene *BAFF* (rs9514828), posição -871, está associado com susceptibilidade diferencial ao pênfigo foliáceo endêmico, sendo o alelo T menos frequente em pacientes (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009). Estudos mostraram que monócitos de indivíduos portadores do alelo T, assim como linhagens celulares quando transfectadas com o alelo T deste SNP produzem maior quantidade da molécula (KAWASAKI *et al.*, 2002; NOVAK *et al.*, 2006). Porém, dados de PCR em tempo real quantitativa e citometria de fluxo indicam que pode ser o inverso, com o alelo T, que confere proteção ao PFE, apresentando menor produção de BAFF (DE ALMEIDA e PETZL-ERLER, 2012). Além da associação encontrada entre um polimorfismo de *BAFF* e o PFE, foi visto que *BAFF* é mais expresso em células T CD4⁺ de pacientes com a forma generalizada do PFE sem tratamento quando comparados com indivíduos sem a doença e também é menos expresso em células

T CD4⁺ de pacientes sob tratamento quando comparados a pacientes sem tratamento (MALHEIROS *et al.*, 2014).

O SNP da região promotora de *BAFF* associado ao PFE (rs9514828) está num provável sítio de ligação para o fator de transcrição MZF1 (NOVAK *et al.*, 2006), porém este sítio não foi confirmado experimentalmente. HUANG *et al.* (2011) mostraram que mutações sítio dirigidas no promotor de *BAFF* em regiões muito próximas a este SNP, iniciando a apenas dois pares de base de distância, impedem a ligação de NF-κB, reduzindo a expressão do gene. A influência do SNP na ligação do NF-κB ainda não foi avaliada.

Os genes *APRIL*, *BAFFR*, *TACI* e *BCMA* são bem menos estudados que o gene *BAFF*. Alguns estudos objetivando a identificação de polimorfismos nestes genes encontraram poucas variantes e, em geral, em frequências muito baixas (ROETTO *et al.*, 1997; LOSI *et al.*, 2005; SALZER *et al.*, 2011). Para o gene *BCMA*, um estudo com japoneses identificou sete posições variáveis, que na população ocorriam principalmente em quatro haplótipos. Estes polimorfismos foram avaliados quanto à susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide nesta mesma população, mas nenhuma associação foi observada (KAWASAKI *et al.*, 2001). Também em japoneses a avaliação de polimorfismos no gene *APRIL*, demonstrou a presença de dois SNPs que causam substituições de aminoácidos, um deles está associado ao lúpus eritematoso sistêmico (KOYAMA *et al.*, 2003). Esta associação foi replicada posteriormente num estudo que identificou mais SNPs no gene e descreveu um haplótipo de susceptibilidade e um de proteção ao lúpus e também descreveu ausência de associação com artrite reumatoide (KAWASAKI *et al.*, 2007).

Além do SNP na região promotora do gene *BAFF* descrito acima, posição -871, nenhum outro polimorfismo do gene *BAFF*, assim como nenhum polimorfismo de *APRIL* nem de qualquer dos receptores para estas moléculas (*BAFFR*, *BCMA* ou *TACI*), foi investigado quanto à susceptibilidade diferencial ao PFE. Considerando-se a existência de sítios polimórficos nos genes *BAFF*, *APRIL*, *BAFFR*, *TACI* e *BCMA* e a importância que a variação da expressão destas moléculas pode ter no contexto de doenças autoimunes, como foi bem demonstrado no caso de *BAFF*, nossa hipótese é que polimorfismos dos genes *BAFF*, *APRIL*, *BAFFR*, *TACI* e *BCMA* têm efeitos funcionais diretamente envolvidos na patogênese do pênfigo foliáceo, sendo estes alguns dos fatores responsáveis pela susceptibilidade diferencial ao PFE.

3. OBJETIVOS

BAFF, APRIL e seus receptores têm um papel importante em doenças autoimunes, sendo inclusive alvos terapêuticos para algumas delas. Parecem ter também um papel na doença pênfigo foliáceo endêmico (PFE), o qual ainda precisa ser melhor compreendido. Sabe-se que um SNP na região promotora do gene *BAFF* está associado à doença e que o gene é mais expresso em células T CD4⁺ de pacientes quando comparados a indivíduos sem a doença. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é compreender a importância de polimorfismos dos genes *BAFF*, *APRIL*, *TACI*, *BAFFR* e *BCMA* na susceptibilidade diferencial ao PFE.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar se polimorfismos dos genes *BAFF*, *APRIL*, *TACI*, *BAFFR* e *BCMA* estão associados à susceptibilidade diferencial ao PFE;
- Verificar se pacientes de PFE e/ou PV apresentam maiores quantidades de RNA mensageiro de *BAFF*, *APRIL*, *TWEPRIL*, *TACI*, *BAFFR* e/ou *BCMA* em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) , quando comparados a indivíduos que não têm a doença;
- Descrever os níveis de autoanticorpos anti-desmogleína 1 e 3 no soro de pacientes de PFE, de pacientes de PV e de indivíduos sem pênfigo, que habitam e que não habitam áreas endêmicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho teve diferentes objetivos, com diferentes abordagens: estudo de associação caso-controle com polimorfismos selecionados nos genes de interesse; análise dos autoanticorpos e de proteínas de interesse no soro de pacientes e indivíduos sem a doença; análise dos níveis de mRNA (RNA mensageiro) dos genes de interesse em células sanguíneas. Cada uma destas abordagens será detalhada nos itens abaixo.

4.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO CASO-CONTROLE

4.1.1 Amostra populacional

A amostra populacional para o estudo de associação foi constituída por dois grupos: pacientes com PFE e indivíduos controle, sem a doença. Os pacientes com PFE foram diagnosticados com base em dados clínicos e imunohistoquímicos. Os indivíduos controle não podem ter sido diagnosticados com nenhuma doença autoimune e nem terem familiar consanguíneo diagnosticado com pênfigo. Uma amostra de sangue dos indivíduos foi coletada para posterior extração de DNA e, quando fosse o caso, separação celular e extração de RNA. As extrações de DNA foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (MANIATIS *et al.*, 1982, com alterações). A amostra foi constituída por 363 pacientes e 249 controles, provenientes majoritariamente de áreas endêmicas, cujas amostras de sangue foram coletadas, principalmente (84% dos controles e 79% dos pacientes), no Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS); mas também em hospitais de Curitiba (Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque e Hospital Santa Casa de Misericórdia), de Ribeirão Preto (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP) e de Uberaba (Lar da Caridade Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba).

Como a população brasileira é miscigenada e os indivíduos podem ter diferentes contribuições de cada grupo étnico que a forma, os indivíduos da amostra foram classificados quanto ao seu grupo étnico de origem. Esta classificação foi feita por membros da equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), baseando-se em características fenotípicas, como cor e tipo de cabelo, formato do rosto, dos olhos, do nariz e da boca e cor da pele.

Em estudos anteriores, foi visto que havia um gradiente de alelos *HLA* de origem africana e de origem europeia nos indivíduos classificados como brancos, mulatos e negros (BRAUN-PRADO *et al.*, 2000; PROBST *et al.*, 2000), mostrando a concordância desta classificação com o componente genético dos indivíduos. No presente trabalho, foram criados dois subgrupos (Tabela 2): eurobrasileiros (EU), composto por indivíduos com origem étnica predominantemente europeia; e mestiços (M), composto por indivíduos com origem étnica miscigenada principalmente entre africanos e europeus.

Na tabela 2 é mostrada uma descrição detalhada da amostra. As coletas foram realizadas durante vários anos pela equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR. A idade média no momento da primeira coleta foi 46 anos para os controles, com desvio padrão de 16. Enquanto que para os pacientes a média foi de 41 anos, com desvio padrão de 17,5.

Tabela 2. Descrição da amostra do estudo de associação.

		Região residência							Etnia		
		SU	SD	CO	NO	ND	na	SI	EU	M	outro
P	n	35	56	246	8	1	7	10	193	147	23
	%	9,6	15,4	67,8	2,2	0,3	1,9	2,8	53,2	40,5	6,3
C	n	32	8	202	3	0	0	4	162	80	7
	%	12,9	3,2	81,1	1,2	0	0	1,6	65,1	32,1	2,8
		Escolaridade							Sexo		
		Anf	FuI	FuC	MeI	MeC	SuI	SuC	SI	F	Ma
P	n	80	182	31	25	30	1	5	9	198	165
	%	22	50,1	8,5	6,9	8,3	0,3	1,4	2,5	54,5	45,5
C	n	35	113	35	13	29	4	8	12	121	128
	%	14,1	45,4	14,1	5,2	11,6	1,6	3,2	4,8	48,6	51,4
		Ocupação principal					Local de coleta				
		rural	serviços	limpeza	outro	SI	HAP	FMRP	HFSU	CWB	
P	n	168	42	69	50	34	285	26	23	29	
	%	46,3	11,6	19,0	13,8	9,4	78,5	7,2	6,3	8,0	
C	n	87	32	35	27	68	210	6	0	33	
	%	34,9	12,9	14,1	10,8	27,3	84,3	2,4	0	13,3	

P: pacientes; C: controles; n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; SU: região sul; SD: região sudeste; CO: região centro-oeste; NO: região norte; ND: região nordeste; na: indivíduos de fora do Brasil; SI: sem informação; EU: eurobrasileiros; M: mestiços; Anf: analfabeto; FuI: ensino fundamental incompleto; FuC: ensino fundamental completo; MeI: ensino médio incompleto; MeC: ensino médio completo; SuI: ensino superior incompleto; SuC: ensino superior completo; F: feminino; Ma: Masculino; HAP: Hospital Adventista do Pênfigo; FMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; HFSU: Lar da Caridade Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba; CWB: Hospitais de Curitiba (Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque e Hospital Santa Casa de Misericórdia).

Na tabela 2 também está listada a principal ocupação dos indivíduos em quatro categorias: rural, serviços, limpeza e outro. Esta categorização é necessária, pois o número de profissões observadas foi bem amplo. A categoria rural engloba principalmente lavradores e pecuaristas. A categoria serviços engloba diversas profissões relacionadas a prestações de serviço, como eletricista, motorista, trabalhador da construção civil e prestador de serviços administrativos. A categoria limpeza consiste em profissionais que trabalham como auxiliar de limpeza, domésticas e também dona de casa. Demais profissões, como militar, profissional da educação, profissional da saúde, trabalhador da indústria e estudante, foram classificadas na categoria “outro”. Foi considerada para esta tabela a ocupação que os indivíduos tiveram por maior tempo ao longo de suas vidas. Esta preocupação em considerar a ocupação dos indivíduos se deve ao fato de muitos pacientes serem trabalhadores rurais, levantando uma hipótese de que talvez a exposição ao fator ambiental de risco esteja relacionada com esta ocupação. Um pareamento por ocupação foi inclusive adotado num estudo em busca do fator ambiental de risco ao PFE (LOMBARDI *et al.*, 1992).

Além destas amostras, foi genotipada também uma amostra de 452 indivíduos de origem predominantemente europeia da população de Curitiba e região metropolitana, chamada de CWB. Porém, nem todos os 452 indivíduos foram genotipados para todos os SNPs. Quando possível (ver item 4.1.4), esta amostra foi unida à amostra de indivíduos controle para aumentar o poder estatístico dos testes.

4.1.2 Seleção de marcadores para estudo de associação

Para o estudo de associação, era importante que os marcadores fossem polimórficos, de preferência com o alelo mais frequente não ultrapassando 90% de frequência. Além disso, havia um interesse maior por marcadores que tivessem maior chance de ter um efeito funcional. Duas estratégias foram utilizadas: (a) o sequenciamento de regiões de interesse, para garantir que os marcadores selecionados nestas regiões fossem polimórficos nas populações a serem estudadas, assim como para buscar possíveis polimorfismos destas populações que ainda não tivessem sido descritos; e (b) a seleção de marcadores a partir de bases de dados *online*. Foi realizado sequenciamento de duas regiões de interesse: a região promotora do gene *APRIL* e a região 3' não traduzida (UTR) do gene *BAFF*. O sequenciamento foi feito em uma subamostra de 21 indivíduos da amostra do estudo de associação e em mais 5

indivíduos da amostra da população de Curitiba (CWB). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento (Tabela 3) foram desenhados com base nas sequências disponíveis para estes genes nos bancos de dados *online*, como o *Ensembl Genome Browser* e *HapMap Genome Browser*. O desenho dos *primers* foi feito com a ferramenta *Primer3*, dentro do software *Geneious* v.5.5.6 (criado por Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>). Os oligonucleotídeos gerados foram ainda avaliados para formação de alças ou dímeros na ferramenta *Oligo Analyzer* (IDT®) e também quanto a sua especificidade, utilizando o *BLAST*® (NCBI).

Tabela 3. Sequências dos *primers* desenhados para amplificação e sequenciamento.

Nome do <i>primer</i>	Gene	Procedimento	Sequência (5'-3')	Tam
BlyS_UTR_amp_F	<i>BAFF</i>	PCR	GTCCGTTGGTGTATTTGAAGTGTG	1823 pb
BlyS_UTR_amp/seq3_R	<i>BAFF</i>	PCR e seq	TGGGTGTTGCTAGACAACTCAGTCA	
BlyS_UTR_seq1_F	<i>BAFF</i>	seq	GTTGTATAACCACTTATAGTTCTT	
BlyS_UTR_seq1_R	<i>BAFF</i>	seq	TGTCCTAGAGATGTGGGCACCTG	
BlyS_UTR_seq2_F	<i>BAFF</i>	seq	GGACACAATTCAAAGGGGCAGT	
BlyS_UTR_seq2_R	<i>BAFF</i>	seq	ACCGGGATGCTGTCTTCTGAG	
BlyS_UTR_seq3_F	<i>BAFF</i>	seq	TGCTCTTCTGTTCAAACCTGCTGCT	
APRIL_prom_amp_F	<i>APRIL</i>	PCR	CCACCGCCCACTCTCCACCT	924 pb
APRIL_prom_amp_R	<i>APRIL</i>	PCR	TAAGGCTGGGCCGGGTGTGT	
APRIL_prom_seq_F	<i>APRIL</i>	seq	AAGAGGGGCTGGACCTGGCG	
APRIL_prom_seq_R	<i>APRIL</i>	seq	ACAAAGCAGCGGCCTCAAGC	

Tam: tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos amplificados. PCR: reação em cadeia da polimerase; seq: sequenciamento; pb: pares de base.

A amplificação da região 3'UTR de *BAFF* foi feita com tampão sulfato uma vez (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer*, 0,75 unidade de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 30 ng de DNA e água ultrapura para completar 15 µL. A reação se deu com 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C, após uma extensão final a 72°C por 5 minutos e 10°C até a retirada do termociclador. Para amplificação da região promotora de *APRIL* foram usados tampão uma vez (100 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer*, 0,3 unidade de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 30 ng de DNA e água ultrapura para completar 15 µL. A reação se deu com 2 minutos a 94°C, seguida de 10 ciclos de 30 segundos a 94°C e 1:30 minuto a 72°C, seguidos de 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30

segundos a 65°C e 1 minuto a 72°C, após uma extensão final a 72°C por 5 minutos e 10°C até a retirada do termociclador.

Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação. Doze microlitros dos produtos amplificados foram, então, purificados com 4,7 unidades de exonuclease I e 0,9 unidades de fosfatase alcalina. O DNA amplificado e purificado foi submetido à reação de sequenciamento, com 2 µL de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®), tampão uma vez, 0,5 µM de *primer*, aproximadamente 20 ng do DNA purificado e água para completar 10 µL. A reação se deu com 1 minuto a 96°C, seguido de 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 54°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos, mantidos a 4°C até a retirada do termociclador. Foi feita a precipitação do produto da reação de sequenciamento com EDTA e etanol e a ressuspensão em formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems®) para corrida no sequenciador 3500xL (Applied Biosystems®).

Após verificação da qualidade dos eletroferogramas, as sequências foram analisadas com o *software* Variant Reporter v1.1.0 (Applied Biosystems®), que compara as sequências obtidas com uma sequência de referência, procurando por posições variantes. As sequências de referência foram as mesmas utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos. As variantes identificadas na análise (Figuras 4 e 5, SNPs assinalados com *) foram consideradas de interesse e foi consultado seu código *rs*. Nenhuma variável ainda não descrita foi observada.

Além dos polimorfismos observados no sequenciamento, variações descritas anteriormente foram também incluídas como de interesse. A seleção de marcadores já descritos foi feita com base em dados disponíveis em bancos de dados *online*, como o *dbSNP* (NCBI) e o *HapMap Genome Browser*. Foram preferencialmente selecionados SNPs com dados de frequência para diversas populações e nos quais a frequência do alelo mais comum não ultrapassasse 90%. Foram priorizados SNPs que tivessem maior probabilidade de ter uma consequência funcional e SNPs incluídos em outros estudos de associação. Além disso, foi considerada a localização das variantes nos genes, para buscar a maior cobertura possível de cada gene. Devido a proximidade de *APRIL* do gene *TWEAK* e pela ocorrência do transcrito combinado TWE-PRIL (PRADET-BALADE *et al.*, 2002), foram incluídas também variantes no gene *TWEAK*. No caso de *BAFF*, foi também incluído o SNP já estudado (MALHEIROS e PETZL-ERLER,

2009), rs9514828, para que a genotipagem fosse realizada nas amostras coletadas após a publicação do trabalho anterior.

O conjunto de SNPs de interesse (Figuras 4 a 8) foi utilizado como entrada para o programa *Assay Design Suite* (Sequenom®, Inc), para desenhar os ensaios de genotipagem (ver tópico 4.1.3). Para o desenho dos ensaios, são informados os códigos *rs* dos SNPs de interesse e o programa recupera as sequências flanqueadoras de bancos de dados, desenha os *primers* e planeja os conjuntos para a *multiplex*. Os SNPs de interesse do presente trabalho foram inseridos juntamente com outros SNPs de outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR. Nem todos os SNPs de interesse puderam ser inseridos em ensaios, sendo que o conjunto total de SNPs a serem genotipados pode ser visto na Tabela 4. Foram desenhados dois ensaios *multiplex*, chamados de 2 e 3C. Outros 2 ensaios, NZ1 e NZ2, foram desenhados pela empresa Liggins Institute, na Universidade de Auckland, Nova Zelândia. Alguns SNPs que tiveram resultados insatisfatórios no conjunto 2 foram reinseridos para o desenhos dos demais ensaios.

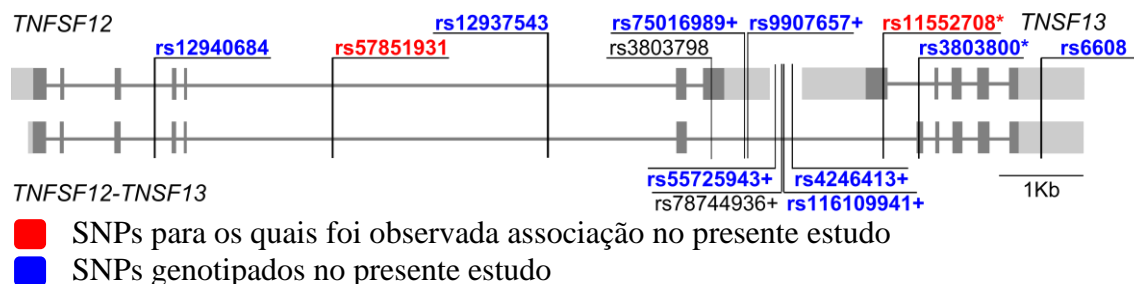


Figura 4. Conjunto de SNPs de interesse para os genes *APRIL* (*TNFSF13*) e *TWEAK* (*TNFSF12*). Localizações de todos os SNPs que foram considerados de interesse após sequenciamento(+) e seleção baseada em bancos de dados para os genes *APRIL* e *TWEAK*. A figura foi gerada com a ferramenta Gene Drawer 1.0 (disponível em: http://www.inf.ufpr.br/aev11/gene-drawer/gene_drawer.html#). *: SNPs que levam a alteração de aminoácido na proteína.

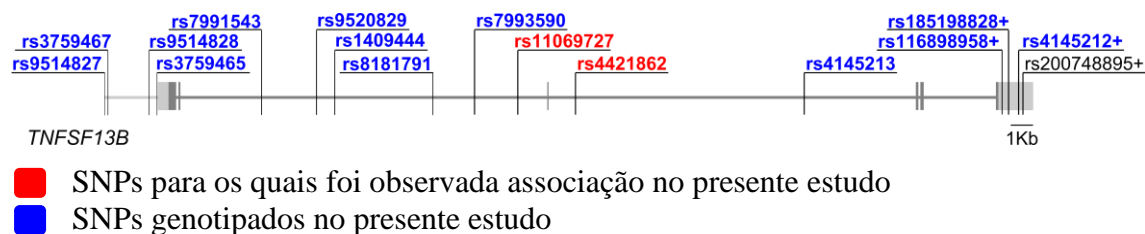


Figura 5. Conjunto de SNPs de interesse para o gene *BAFF* (*TNFSF13B*). Localizações de todos os SNPs que foram considerados de interesse após sequenciamento(+) e seleção baseada em bancos de dados para o gene *BAFF*. A figura foi gerada com a ferramenta Gene Drawer 1.0 (disponível em: http://www.inf.ufpr.br/aev11/gene-drawer/gene_drawer.html#).

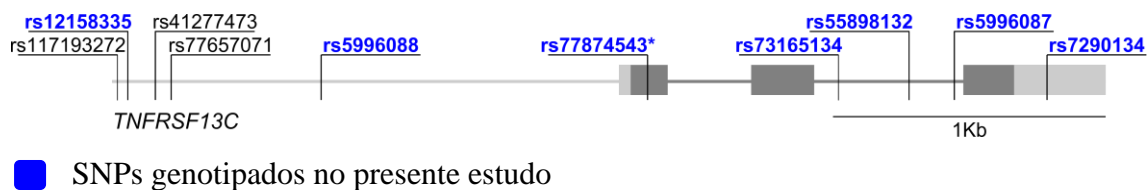


Figura 6. Conjunto de SNPs de interesse para o gene *BAFFR* (*TNFRSF13C*). Localizações de todos os SNPs que foram considerados de interesse após seleção baseada em bancos de dados para o gene *BAFFR*. A figura foi gerada com a ferramenta Gene Drawer 1.0 (disponível em: http://www.inf.ufpr.br/aev11/gene-drawer/gene_drawer.html#). *: SNPs que levam a alteração de aminoácido na proteína.

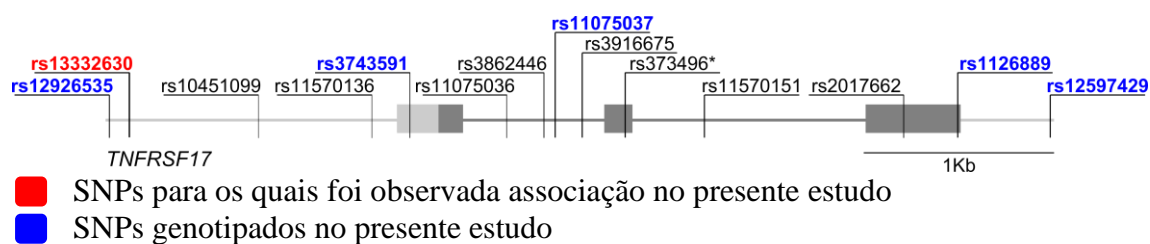


Figura 7. Conjunto de SNPs de interesse para o gene *BCMA* (*TNFRSF17*).

Localizações de todos os SNPs que foram considerados de interesse após seleção baseada em bancos de dados para o gene *BCMA*. A figura foi gerada com a ferramenta Gene Drawer 1.0 (disponível em: http://www.inf.ufpr.br/aev11/gene-drawer/gene_drawer.html#). *: SNPs que levam a alteração de aminoácido na proteína.

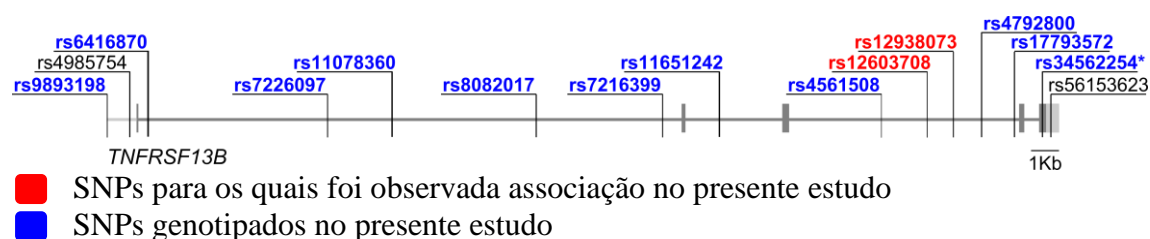


Figura 8. Conjunto de SNPs de interesse para o gene *TACI* (*TNFRSF13B*).

Localizações de todos os SNPs que foram considerados de interesse após seleção baseada em bancos de dados para o gene *BCMA*. A figura foi gerada com a ferramenta Gene Drawer 1.0 (disponível em: http://www.inf.ufpr.br/aev11/gene-drawer/gene_drawer.html#). *: SNPs que levam a alteração de aminoácido na proteína.

Tabela 4. Localização dos 52 SNPs selecionados para genotipagem e conjuntos de SNPs em cada ensaio multiplex utilizado para a genotipagem.

SNP	gene	ensaio	Posição no cromossomo (construção GRCh38)	cromossomo	Localização	Alelos
rs55725943	APRIL	2/NZ1	7557950	17	promotor	G>C
rs116109941	APRIL	2	7558051	17	promotor	A>G
rs4246413	APRIL	2	7558152	17	promotor	C>T
rs11552708	APRIL	3C	7559238	17	exon 1*	G>A
rs3803800	APRIL	NZ1	7559652	17	exon 2*	G>A
rs6608	APRIL	NZ1	7561096	17	3' UTR	C>T
rs9514827	BAFF	NZ1	108267055	13	promotor	T>C
rs3759467	BAFF	NZ2	108267192	13	promotor	A>G
rs9514828	BAFF	NZ2	108269025	13	promotor	C>T
rs3759465	BAFF	NZ2	108269382	13	promotor	A>G
rs7991543	BAFF	NZ2	108274047	13	íntron 2	T>A
rs9520829	BAFF	3C	108276502	13	íntron 2	G>C
rs1409444	BAFF	NZ2	108277315	13	íntron 2	T>C
rs8181791	BAFF	3C	108281697	13	íntron 2	A>G
rs7993590	BAFF	NZ1	108283554	13	íntron 2	A>T
rs11069727	BAFF	3C	108285485	13	íntron 2	A>G
rs4421862	BAFF	NZ2	108288060	13	íntron 3	G>A
rs4145213	BAFF	NZ2	108298270	13	íntron 3	G>T
rs116898958	BAFF	NZ2	108307102	13	3' UTR	C>T
rs185198828	BAFF	2	108307392	13	3' UTR	G>T
rs4145212	BAFF	NZ2	108307840	13	3' UTR	T>A
rs7290134	BAFFR	2	41925247	22	3' UTR	A>G
rs5996087	BAFFR	2	41925587	22	íntron 2	A>G
rs55898132	BAFFR	2	41925753	22	íntron 2	G>C
rs73165134	BAFFR	2	41926012	22	íntron 2	C>G
rs77874543	BAFFR	2/NZ2	41926712	22	exon 1*	G>C
rs5996088	BAFFR	2	41927909	22	promotor	C>T
rs12158335	BAFFR	3C	41928618	22	promotor	T>G
rs12926535	BCMA	2	11963596	16	promotor	G>A
rs13332630	BCMA	2	11963701	16	promotor	A>C
rs3743591	BCMA	2	11965175	16	5' UTR	A>G
rs11075037	BCMA	2/3C	11965938	16	íntron 1	T>C
rs1126889	BCMA	2	11968053	16	3' UTR	C>G
rs12597429	BCMA	2	11968539	16	3' flanqueadora ⁺	T>C
rs34562254	TACI	NZ1	16939677	17	exon 5*	C>T
rs17793572	TACI	2	16940678	17	íntron 3	G>A
rs4792800	TACI	2	16941853	17	íntron 3	A>G
rs12938073	TACI	2/NZ2	16942862	17	íntron 3	T>A
rs12603708	TACI	3C	16943799	17	íntron 3	G>A
rs4561508	TACI	2	16945436	17	íntron 3	C>T
rs11651242	TACI	2	16951232	17	íntron 2	T>G
rs7216399	TACI	2	16953264	17	íntron 1	G>A
rs8082017	TACI	2	16957784	17	íntron 1	A>C
rs11078360	TACI	2	16962940	17	íntron 1	G>A
rs7226097	TACI	2	16965247	17	íntron 1	T>C
rs6416870	TACI	2	16971667	17	íntron 1	T>C
rs9893198	TACI	2	16973169	17	promotor	G>A
rs12940684	TWEAK	3C	7550602	17	íntron 3	T>C
rs57851931	TWEAK	NZ1	7552704	17	íntron 5	A>G
rs12937543	TWEAK	NZ1	7555265	17	íntron 5	A>T
rs75016989	TWEAK	3C	7557589	17	3' UTR	C>G
rs9907657	TWEAK	2	7557640	17	3' UTR	G>T

UTR: região não traduzida; *: variantes que levam à alteração de aminoácido na proteína codificada; ⁺: SNP localizado a menos de 500 pares de base do final do último éxon. Informações retiradas do banco de dados dbSNP (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Posição no cromossomo referente à construção GRCh38.

4.1.3 Genotipagem dos marcadores

Os marcadores selecionados foram genotipados na amostra descrita no tópico 4.1.1. Esta genotipagem foi realizada pelo método de MassARRAY®, utilizando a plataforma iPLEX® (Sequenom®, Inc), uma metodologia de genotipagem *multiplex* (GABRIEL *et al.*, 2009), de acordo com as recomendações do fabricante. Nesta metodologia, SNPs são genotipados com base em espectrometria de massa, diferenciando o alelo pela diferença de massa entre as bases nitrogenadas e possibilitando a análise de até 42 SNPs simultaneamente. O equipamento utilizado no presente trabalho encontra-se no Laboratório de Análise Genética e Molecular, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os conjuntos NZ1 e NZ2 foram genotipados pela empresa Liggins Institute, na Universidade de Auckland, Nova Zelândia.

A metodologia (Figura 9) é constituída, basicamente, por uma amplificação por PCR *multiplex* das regiões contendo os SNPs de interesse, seguida de uma purificação do produto por enzima fosfatase alcalina. Este produto é, então, submetido a uma reação de extensão, que utiliza um *primer* complementar à região flanqueadora de cada SNP, terminando na base exatamente adjacente ao SNP. Nesta reação, são utilizados dideoxinucleotídeos (ddNTPs), permitindo a adição de apenas uma base ao *primer*, sendo justamente a base complementar ao alelo do SNP presente na fita molde. Os produtos desta reação são submetidos à espectrometria de massa MALDI-TOF, sendo possível a identificação de cada alelo.

Para análise dos resultados foi utilizado o software *Typer* (Sequenom®, Inc). O desenho do ensaio é informado previamente, podendo ser feita uma previsão da massa esperada para cada alelo de cada loco. A qualidade da genotipagem pode ser verificada pela altura dos picos e pela separação dos alelos em gráficos (Figura 10). Marcadores que apresentaram padrões de picos ou agrupamentos de alelos não confiáveis foram excluídos das análises. Em cada placa utilizada para a genotipagem eram incluídas 6 amostras previamente genotipadas para verificação da concordância entre as genotipagens. Além disso, algumas amostras foram repetidas por dúvidas em alguns SNPs, servindo também como controle de qualidade para as genotipagens dos demais SNPs. O máximo de discordância entre genotipagens foi de 6% para o SNP rs8181791

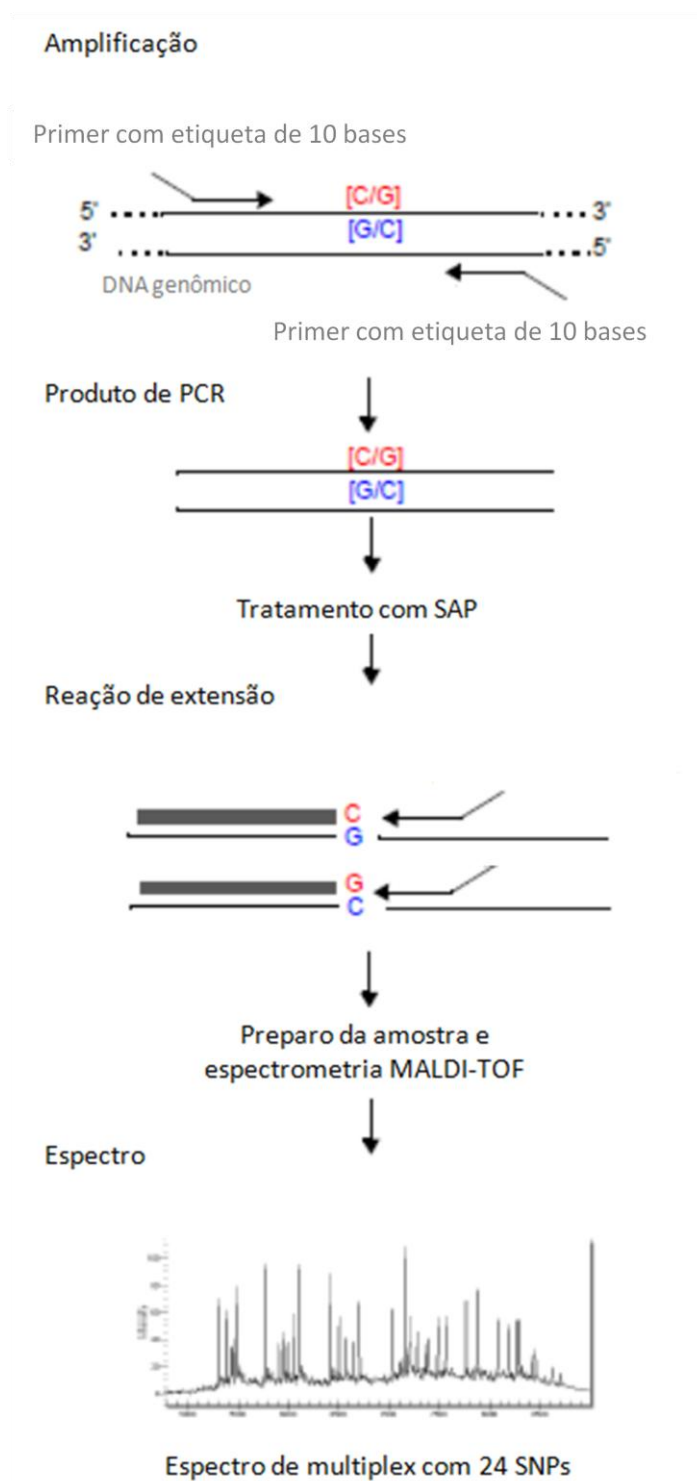


Figura 9. Esquema da metodologia de MassARRAY®, destacando um SNP como exemplo. (Figura adaptada de: OETH *et al.*, 2007)

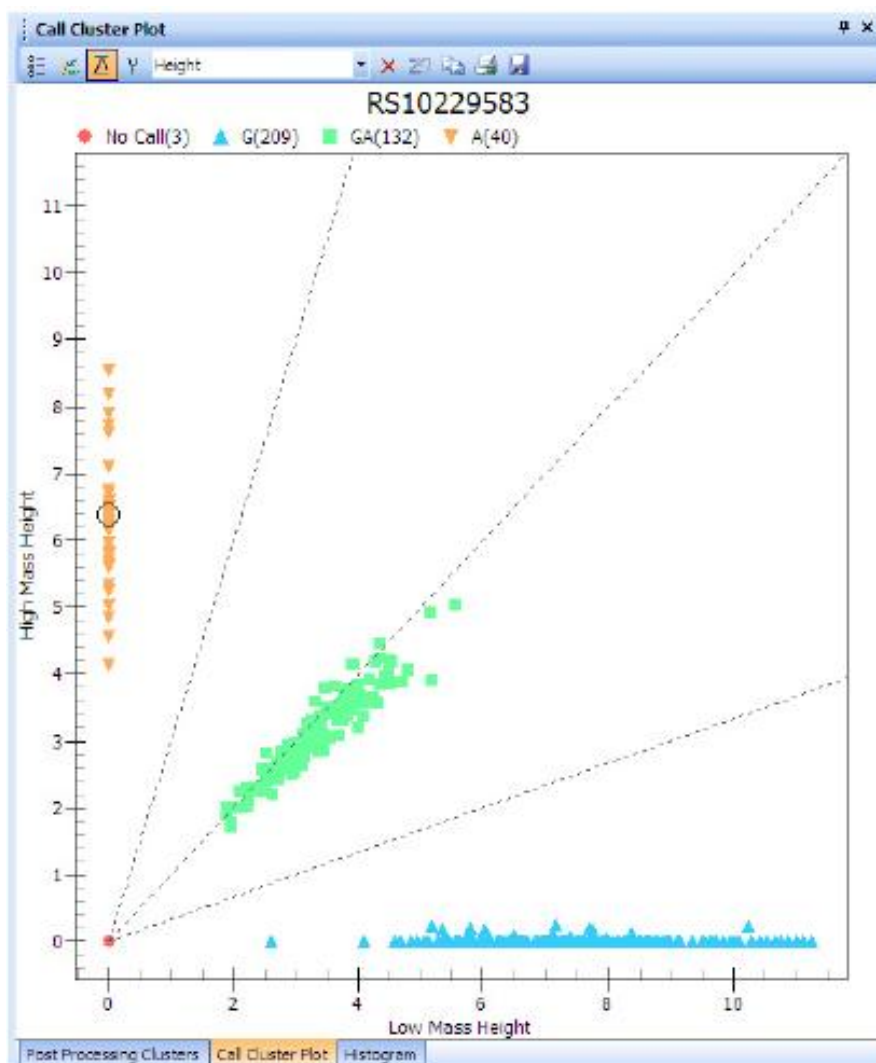


Figura 10. Exemplo de gráfico da visualização dos genótipos gerado pelo programa TYPER® (Sequenom®). (FONTE: TYPER 4.0.20 User's Guide, Sequenom®, Inc)

(*BAFF*), porém as amostras para as quais houve discordância foram amostras com muitas falhas e que muitas vezes tiveram que ser excluídas. A maioria dos SNPs teve uma taxa de discordância abaixo de 2%, sendo que para alguns nenhuma discordância foi observada em mais de 100 repetições.

4.1.4 Análise estatística do estudo de associação

Foram estimadas frequências alélicas e genotípicas por contagem para todos os marcadores genotipados. Para investigar se os SNPs estão associados ao PFE, estas frequências foram comparadas entre pacientes e controles utilizando o teste exato de Fisher, na página VassarStats (VassarStats: Website for Statistical Computation; disponível em: <http://vassarstats.net>). Para a comparação das frequências alélicas, foi

comparado o número de pacientes e de controles com um dos alelos e o número de pacientes e controles com o outro alelo. Para as frequências genotípicas, foi escolhido um genótipo de referência (o homozigoto mais frequente nos controles) e foram comparados pacientes e controles com cada um dos outros dois genótipos, sempre em relação a pacientes e controles com o genótipo de referência. Valores de P inferiores a 0,05 indicam diferenças significativas, revelando associação da variante com a doença. Quando o tamanho amostral era muito grande, maior que 1000 para tabelas 2 x 2, o teste de qui-quadrado foi utilizado no lugar do teste exato de Fisher para o cálculo do valor de P , também na página VassarStats (VassarStats: Website for Statistical Computation; disponível em: <http://vassarstats.net>). Quando o valor de P para a associação foi menor que 0,10, foi analisada também a associação utilizando-se frequências de portadores de cada alelo, para analisar os modelos de dominância e recessividade nas associações. Nestas análises, pacientes e controles portadores de um alelo, em homozigose ou heterozigose, foram somados e comparados com pacientes e controles homozigotos para o outro alelo.

Para cada alelo, genótipo e haplótipo foi estimada a razão de probabilidade (OR), dada pela fórmula $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOOLF, 1955), sendo os valores de A, B, C e D retirados da seguinte tabela:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

Os valores de OR, a partir de alelos e genótipos como explicado acima, correspondem ao risco relativo do fator testado. O valor de 1 significa que o risco da doença é igual para indivíduos positivos e negativos para o fator em questão, valores maiores que 1 significam que o fator confere maior risco (susceptibilidade) e valores menores que 1 significam que o fator confere menor risco (proteção) para a doença. A OR, assim como os intervalos de confiança, foram estimados no VassarStats (VassarStats: Website for Statistical Computation; disponível em: <http://vassarstats.net>). A OR foi calculada apenas quando para pacientes ou controles o valor observado era de pelo menos 2 nas duas classes, ou seja, se ambos pacientes e controles tiveram valor 0 ou 1 numa mesma classe, o cálculo de associação não foi realizado. Nos casos em que uma das classes possui valor zero, foi primeiramente calculado o valor de P pelo teste

exato de Fisher, como descrito acima e, apenas quando o valor de P foi menor que 10%, foi acrescentado o valor de 0,5 em todas as classes para possibilitar o cálculo da OR.

As amostras de pacientes e de controles (indivíduos sem a doença) foram agrupadas de acordo com a classificação étnica dos indivíduos, descrita no tópico 4.1.1. As análises foram feitas inicialmente para cada subgrupo separadamente. As frequências alélicas e genotípicas de controles e de pacientes foram, então, comparadas entre os dois subgrupos pelo teste exato de Fisher, no VassarStats (VassarStats: Website for Statistical Computation; disponível em: <http://vassarstats.net>). Para os locos nos quais o valor de P nesta comparação foi menor que 0,10 (um corte mais rigoroso para garantir que só houvesse união de amostras realmente homogêneas), foi feito um ajuste da proporção de indivíduos de cada subgrupo entre pacientes e controles para que fosse feita a análise de associação da amostra total. Este ajuste foi feito excluindo-se aleatoriamente indivíduos do subgrupo com maior proporção nos controles e também nos pacientes, até que a frequência de cada subgrupo fosse igual entre as amostras. Também foram comparadas as frequências alélicas e genotípicas de controles dos subgrupos EU e M com as frequências alélicas e genotípicas de indivíduos com origem predominantemente europeia e de indivíduos de origem étnica mestiça na amostra da população de Curitiba (CWB). Quando as diferenças nesta segunda comparação não foram significativas, esta amostra de Curitiba foi incluída na análise da amostra total. Para estas comparações de subgrupos e amostras foi considerado limiar de significância de 10%.

Para os SNPs associados com valores de P menores que 0,04, foram gerados gráficos com as frequências alélicas e com os valores de OR e intervalo de confiança utilizando a plataforma R, pacote *graphics* versão 3.3.0 (R Core Team, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>). Para estes SNPs, foi feita também uma análise de interação entre os genótipos. Nesta análise, a amostra foi subdividida de acordo com os genótipos de um primeiro SNP. Dentro de cada estrato após a subdivisão, foi feita análise de associação para um segundo SNP, com os cálculos descritos acima.

Além disso, foi feita uma regressão logística, incluindo como variáveis explicativas os genótipos dos SNPs associados, o sexo, a etnia, a ocupação (classificada como rural ou outra), a escolaridade (classificada como (1) até ensino fundamental incompleto ou (2) ensino fundamental completo ou superior) e o local de residência (classificado como Centro Oeste ou outro) dos indivíduos, utilizando a plataforma R,

pacote *stats* versão 3.3.0 (R Core Team, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>). Como pode ser observado na tabela 2, para alguns indivíduos não temos informações para algumas destas variáveis, assim como, para alguns indivíduos, a tipagem de alguns SNPs não foi obtida com sucesso. Estes indivíduos com informações incompletas para alguma das variáveis foram excluídos da análise, sendo que para a regressão logística foram utilizados 274 pacientes e 161 controles.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para todos os locos nos quais a frequência do alelo menos comum foi maior que 2%. O cálculo foi feito em todos os grupos e subgrupos, comparando-se a frequência genotípica esperada com a observada, pelo teste de Qui-Quadrado. Nos casos em que o valor de *P* encontrado foi menor que 10%, se houve pelo menos uma classe com valor esperado inferior a 5, foi aplicada a correção de Yates.

O cálculo de desequilíbrio de ligação e de frequências haplotípicas foi feito para 3 conjuntos de SNPs: SNPs associados com PF que localizavam-se no mesmo gene (rs57851931 e rs11552708) ou no mesmo cromossomo (rs11552708 e rs12938073); SNPs do gene *BAFF* para os quais foi observada diferença de frequência entre os subgrupos EU e M apenas em pacientes e não em controles (rs7993590, rs11069727, rs4421862 e rs4145212); e SNPs do gene *BAFF* para os quais foi observado desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes, não em controles, devido a uma falta de heterozigotos (rs9514827, rs9514828, rs7991543 e rs9520829). As frequências haplotípicas foram estimadas a partir da inferência de fase feita utilizando o pacote de programas Plink (PURCELL *et al.*, 2007, disponível em <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>). Este programa também foi utilizado para calcular o desequilíbrio de ligação (D' e r^2) entre pares de SNPs. O cálculo de associação para os haplótipos foi feito da forma descrita no início desta seção, sendo que o cálculo foi feito apenas quando o haplótipo apresentou pelo menos 2% de frequência em pacientes ou controles.

4.1.5 Análises adicionais com ferramentas de bioinformática

Para o SNP rs4421862, para o qual foi observada uma associação apenas no subgrupo M, foi investigado o desequilíbrio de ligação com SNPs próximos em diferentes populações, de acordo com as informações disponíveis nos bancos de dados. Para isso, foi utilizada a ferramenta SNAP (JOHNSON *et al.*, 2008, disponível em

<https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/index.php>), gerando plots considerando 25kb e 500kb.

Além disso, para os SNPs associados (rs4421862, rs13332630, rs11552708 e rs12938073) e para o SNP rs73611008, não genotipado neste trabalho, mas em desequilíbrio de ligação com rs4421862 em africanos, foi utilizada a ferramenta HaploReg v3 (WARD e KELLIS, 2012, disponível em http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php), para verificar a possibilidade de eles apresentarem uma consequência funcional. Para a entrada no HaploReg, foram utilizados os seguintes parâmetros: r^2 de 0,6 para seleção de SNPs em desequilíbrio de ligação com o SNP investigado; populações europeia e africana; modelo básico para a fonte de epigenomas; ambos os algoritmos para verificar conservação em mamíferos.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS NO SORO

Soro de pacientes de PFE e PV e também de indivíduos controle foi utilizado para avaliação da quantidade de anticorpos anti-desmogleína 1 e anti-desmogleína 3. Para obtenção do soro, foi coletado sangue periférico em tubo de coleta com ativador de coagulação (BD Vacutainer®). O soro obtido foi então armazenado congelado à -70°C até o momento da análise. Para evitar problemas com degradação, foram utilizadas apenas amostras coletadas a partir de 2011. A amostra se constitui de 68 pacientes de PFE, 20 pacientes de PV e 48 controles. Para 9 pacientes e 2 controles, estavam disponíveis mais de uma amostra. Se as diferentes amostras foram coletadas em momentos nos quais o paciente estava em condições similares quanto à gravidade das lesões e o tratamento imunossupresor, foi feita a média dos valores obtidos e analisado como uma única amostra, assim como no caso dos controles, neste caso apenas no quesito idade dos indivíduos. Porém, se havia diferença nas condições citadas no momento da coleta, as diferentes amostras foram mantidas para as análises. Para esta análise, foram incluídos indivíduos controle da área endêmica (n = 9) e de área não endêmica (n = 39).

Para a dosagem dos anticorpos, foi utilizada a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), com kits da marca MBL® (RG-M7593-D e RG-7680-EC-D), no qual são usadas amostras de referência. Se o valor de quantificação obtido for menor

que 14 U/mL, a amostra é considerada negativa, se for maior do que 20 U/mL, a amostra é positiva. Não há necessidade de duplicatas, mas algumas amostras foram repetidas pelo menos 2 vezes (22 para anti-desmogleína 1 e duas para anti-desmogleína 3), obtendo-se sempre resultados muito próximos (maior desvio padrão observado foi de 1,9 U/mL entre as amostras negativas (maior leitura: 3,5 U/mL; menor leitura: -0,38 U/mL) e de 49 U/mL entre as positivas (maior leitura: 275,5 U/mL; menor leitura: 206,6 U/mL), nunca alterando a interpretação do valor). Todos os indivíduos foram testados para a presença de anticorpo anti-desmogleína 1 e 50 pacientes e 33 controles foram testados para presença de anticorpo anti-desmogleína 3.

Para estas análises, os pacientes foram organizados em subgrupos de acordo com a presença ou não de lesões no momento da coleta e também se estavam ou não sob tratamento imunossupressor. Os valores da quantificação de anticorpo anti-desmogleína 1 foram comparados entre os seguintes subgrupos: Controles (indivíduos controle que não habitam área endêmica para PFE, n = 39), CE (indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para o PFE, n = 9), PFCLCT (pacientes de PFE com lesões e sob tratamento imunossupressor no momento da coleta, n = 43), PFCLST (pacientes de PFE com lesões, mas sem tratamento imunossupressor no momento da coleta, n = 5), PFSLCT (pacientes de PFE sem lesões, mas sob tratamento imunossupressor no momento da coleta, n = 11), PFSLST (pacientes de PFE sem lesões e nem tratamento imunossupressor no momento da coleta, n = 14) e PV (pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor no momento da coleta, n = 21).

Outra subdivisão dos pacientes de PFE foi feita, considerando a gravidade das lesões ou há quanto tempo o paciente encontra-se sem lesões. Foram criados 4 subgrupos: 1) pacientes com muitas lesões (n = 6); 2) pacientes com lesões já em cicatrização ou muito poucas lesões (n = 42); 3) pacientes que não apresentam novas lesões há, no máximo, 18 meses (n = 14); 4) pacientes que não apresentam lesões há mais de 2 anos (n = 7).

Os pacientes foram ainda agrupados quanto à dose de tratamento imunossupressor (prednisona) no momento da coleta: menor que 10 mg, entre 10 e 20 mg, entre 20 e 30 mg, 40 mg e maior que 50 mg. Geralmente, pacientes em estado mais grave recebem maiores doses de tratamento imunossupressor. Estes grupos foram, então, comparados quanto aos níveis de anti-desmogleína 1.

Comparações entre subgrupos foram realizadas utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, utilizando a plataforma R, pacote *stats* versão 2.15.3 e versão 3.2.0 (R CORE TEAM, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>). Gráficos do tipo *box plot* foram construídos também com o R, pacotes *fields* versão 3.3.1 e *graphics* versão 3.2.0 (R CORE TEAM, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>). Correlação de Spearman foi feita entre a idade dos pacientes e os níveis de anti-desmogleína 1 (plataforma R, pacote *stats* versão 3.2.0, R CORE TEAM, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>).

Um modelo de regressão múltipla foi também feito, sendo a variável resposta a quantificação de anti-DSG1 e utilizando como variáveis explicativas o sexo, a idade e o subgrupo do indivíduo (Controles, CE, PFCLCT, PFCLST, PFSLCT, PFSLST e PV). Para avaliar se este modelo de regressão era aceitável, foi feita uma análise dos resíduos. Além disso, uma comparação múltipla também foi realizada, para mostrar as diferenças entre os subgrupos. A análise de regressão foi feita na plataforma R, com os pacotes *stats* versão 3.3.0 e *graphics* versão 3.3.0 (R Core Team, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>). Para as análises posteriores foi utilizada a função *apmc* (disponível em: <https://github.com/walmes/wzRfun/blob/master/R/apmc.R>) e os pacotes *doBy* (disponível em <https://cran.r-project.org/web/packages/doBy/index.html>), *multcomp* (disponível em <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/index.html>) e *latticeExtra* (disponível em <https://cran.r-project.org/web/packages/latticeExtra/index.html>).

4.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE mRNA EM PBMC

Os níveis de mRNA (RNA mensageiro) dos genes *BAFF*, *APRIL*, *TACI*, *BAFFR* e *BCMA* foram avaliados por qPCR (PCR quantitativa), pelo método de sonda de hidrólise, em células mononucleares de sangue periférico (PBMC). RNA total foi extraído das células e foi, então, convertido em cDNA por transcrição reversa, utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Este cDNA obtido foi submetido à uma reação de PCR quantitativa em tempo real, na presença de sondas TaqMan® (Applied Biosystems®), no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

Como o PFE é uma doença heterogênea, com grandes variações de quadro clínico entre os pacientes, desde pacientes com pequenas lesões localizadas até pacientes com lesões que espalham-se pelo corpo todo, é importante classificar os pacientes para análises que envolvam expressão gênica. Além da heterogeneidade da doença, o estágio da doença no momento da coleta é de grande relevância. Desse modo, os pacientes foram classificados em grupos, considerando se no momento da coleta o paciente estava com a doença ativa ou inativa e se estava ou não sob tratamento imunossupressor (Tabela 5). A amostra foi composta por 16 pacientes de PFE, 8 pacientes de PV e 4 indivíduos controle (indivíduos sem a doença e residindo fora da área endêmica).

O período de “doença ativa” foi definido como o intervalo entre o início do tratamento (*baseline*) e o momento em que novas lesões deixam de se formar e aquelas já estabelecidas começam a cicatrizar (*control of disease activity*). Este intervalo é referido como “tempo para o controle da doença” (*time to disease control*) e é um período de observação precoce (*early observation point*), segundo (MURRELL *et al.*, 2008). Definimos como “doença inativa” o período em que há ausência de lesões novas ou pré-existentes, enquanto o paciente recebe o tratamento mínimo (no caso de prednisona, administração diária inferior a 10mg). Murrell *et al.* (2008) definem este período como “remissão completa na presença de terapia” (*complete remission on therapy*), para diferenciar da “remissão completa na ausência de terapia” (*complete remission off therapy*), que é caracterizada por um período mínimo de 2 meses sem tratamento sistêmico e ausência de lesões novas ou pré-existentes. Em ambas as situações, trata-se de um período de observação tardio (*late observation point*). No presente trabalho, os termos “doença ativa” e “doença inativa” (Tabela 5) foram utilizados para níveis extremos de atividade do pênfigo, excluindo os níveis intermediários e, portanto, aquilo que Murrell *et al.* (2008) definem como fim da fase de consolidação (*end of the consolidation phase*): momento em que novas lesões deixam de se desenvolver por um mínimo de 2 semanas, aproximadamente 80% das lesões pré-existentes tenham cicatrizado e a maioria dos médicos tenha iniciado a redução dos esteroides. Esta classificação nos permite normalizar a influência dos diferentes níveis de atividade sobre os resultados de expressão gênica.

Tabela 5. Descrição dos indivíduos que compõe a amostra utilizada para análise de expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Código	Idade	Sexo	Grupo	Tratamento	Local da coleta
410ERA	44	M	Controle	sem	Curitiba
068NBP	58	F		sem	Curitiba
100VSR	56	F		sem	Curitiba
430LCP	25	F		sem	Curitiba
P325CEA	47	M	aPFST	sem	Campo Grande
P362BCP	54	F		sem	Uberaba
P391XQG	15	F		sem	Uberaba
P414AIK	28	F		sem	Ribeirão Preto
P399LAF	33	M	aPFCT	20mg prednisona	Uberaba
P342GVN	56	F		60mg prednisona	Campo Grande
P393OKQ	32	F		40mg prednisona	Campo Grande
P396NMK	31	F		60mg prednisona	Uberaba
P508ASC	39	M	iPFST	sem	Ribeirão Preto
P242MRS	62	F		sem	Campo Grande
P380MQJ	17	F		sem	Uberaba
P307LRS	31	F		sem	Campo Grande
P392KEB	38	M	iPFCT	10mg prednisona	Campo Grande
P386JGY	32	M		25mg prednisona	Uberaba
P229MFF	52	F		10mg prednisona	Campo Grande
P382SCD	17	F		30mg prednisona	Campo Grande
PV043EPM	35	M	aPV	80mg prednisona	Curitiba
PV049JNI	54	F		25mg prednisona	Curitiba
PV056SQL	31	F		20mg prednisona	Ribeirão Preto
PV060WQV	38	F		40mg prednisona	Ribeirão Preto
PV047BPV	28	M	iPV	200mg azatioprina	Curitiba
PV017LMT	51	F		15mg prednisona	Curitiba
PV057TOD	34	F		20mg prednisona	Ribeirão Preto
PV045FAW	39	F		20mg prednisona	Uberaba

M: sexo masculino; F: sexo feminino; aPFST: pênfigo foliáceo ativo sem tratamento; aPFCT: pênfigo foliáceo ativo com tratamento; iPFST: pênfigo foliáceo inativo sem tratamento; iPFCT: pênfigo foliáceo inativo com tratamento; aPV: pênfigo vulgar ativo; iPV: pênfigo vulgar inativo.

Para a separação das PBMC foi coletado sangue periférico em tubo de coleta contendo anticoagulante EDTA. Este sangue foi submetido à centrifugação para remoção do plasma e depois diluído em PBS. A partir deste sangue diluído foram separadas células mononucleares (PBMC) pelo método de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077; Sigma; densidade = 1,077 g/mL). As células obtidas foram imediatamente lisadas em TRI Reagent® (Ambion®) e congeladas a -70°C até a extração do RNA. A extração do RNA foi feita com precipitação por isopropanol, lavagem com etanol e solubilização, segundo o protocolo de extração de RNA que acompanha o TRI Reagent®.

Para o gene *BAFF* foi utilizado o ensaio TaqMan® Hs00198106_m1, para o gene *APRIL* foram utilizadas as sondas Hs00601664_g1 (transcrito de *APRIL*) e Hs01650719_m1 (transcrito de *TWE-PRIL*). Os genes dos receptores foram analisados com as seguintes sondas: Hs03045080_m1 para *BCMA*, Hs00606874_g1 para *BAFFR* e Hs00963364_m1 para *TACI*. Para determinação da quantidade ideal de DNA a ser utilizada nas reações, foi feita a PCR quantitativa a partir de uma curva de diluição, utilizando cDNA de um pool de amostras. Nesta curva, dois genes foram testados como controles endógenos, a beta actina humana (*ACTB*) e beta glucuronidase humana (*GUSB*). Para a realização da PCR quantitativa (qPCR) das PBMC, a quantidade de cDNA foi padronizada em 25ng, utilizando *ACTB* como endógeno e utilizando o TaqMan® Universal Master Mix, de acordo com as recomendações do fabricante. Quando uma das triplicatas se mostrou muito diferente das duas outras, esta foi excluída. A média do ciclo de quantificação (*Cq*) das triplicatas foi utilizada nos cálculos.

Os dados foram analisados com o método de *Cq* comparativo ($\Delta\Delta Cq$). Foram comparados os níveis de expressão dos genes entre subgrupos de pacientes de PFE, pacientes de PV e indivíduos controle. Após o cálculo de $\Delta\Delta Cq$, a razão de expressão (*fold change*) foi calculada elevando-se 2 ao valor de $\Delta\Delta Cq$ negativo. Estes valores foram então comparados entre pacientes e controles e também entre os subgrupos de pacientes pelos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, utilizando a plataforma R, pacote *stats* versão 3.2.0 (R Core Team, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>). Gráficos do tipo *box plot* foram construídos também com o R, pacotes *fields* versão 3.3.1 e *graphics* versão 3.2.0 (R Core Team, 2014, disponível em <http://www.R-project.org/>).

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO CASO-CONTROLE

Foram genotipados 51 SNPs, localizados nos genes *BAFF*, *APRIL*, *TWEAK*, *BAFFR*, *BCMA* e *TACI*. Dos 52 SNPs que foram incluídos nos testes (Tabela 4), apenas para o rs11075037 (*BCMA*) não foi possível realizar a genotipagem.

Na tabela 6 estão mostrados os resultados dos testes de homogeneidade entre subgrupos. De acordo com o descrito no item 4.1.4, a amostra total para o estudo de associação foi formada de acordo com o resultado destes testes. Quando não houve diferença significativa entre controles EU e M e nem entre pacientes EU e M, estas subamostras foram unidas para formar a amostra total (total). Quando houve diferença significativa entre controles EU e M, o entre pacientes EU e M, foram ajustadas as proporções de cada subgrupo entre os grupos de pacientes e controles para formar a amostra total (ajustada). Poderia ainda ser acrescentada a amostra da população de Curitiba (CWB), quando não houvessem desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) para esta amostra e, além disso, quando não houvesse diferença entre suas frequências alélicas e genotípicas e as frequências observadas para os subgrupos EU e M. A tabela 6 mostra também como foi composta a amostra total para cada SNP.

Os SNPs rs4145213 (*BAFF*), rs4246413 (*APRIL*), rs12603708 (*TACI*), rs12158335 (*BAFFR*) apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) na amostra de controles (Tabelas 7 a 11) e, portanto, seus resultados devem ser interpretados com cautela. No caso do rs4145213 (*APRIL*), os desvios foram muito acentuados (Tabela 9) e em todos os subgrupos, por isso, a genotipagem deste SNP foi considerada não confiável e ele foi excluído das análises de associação. Além destes, o SNP rs7290134 (*BAFFR*) teve um valor de *P* menor que 0,10 no cálculo do equilíbrio de HW para a sub-amostra EU (Tabela 11), também devendo ser considerado com cautela.

Tabela 6. Valores de P para comparações entre frequências alélicas de subgrupos amostrais.

BAFF	rs9514827	rs3759467	rs9514828	rs3759465	rs7991543	rs9520829	rs1409444	rs8181791
EU e M (C)	0,0459	0,3959	0,0176	0,5420	0,7514	0,0488	0,2830	0,6781
EU e M (P)	0,0152	0,2368	0,0001	0,2177	0,1101	0,0131	0,6210	0,1929
CWB EU	0,5964	0,4026	0,7489	0,8674	0,1977	0,0925	0,1603	0,1681
CWB M	1	1	~1	0,7431	0,7066	0,4865	1	0,0629**
Am. Total	ajustada	total*	aj. + CWB	tot. + CWB	tot. + CWB	ajustada	tot. + CWB	total
BAFF	rs7993590	rs11069727	rs4421862	rs4145213	rs116898958	rs185198828	rs4145212	
EU e M (C)	0,7355	0,5779	0,2384	0,0359	0,5710	0,5773	0,3542	
EU e M (P)	0,0065	0,0005	0,0027	0,7975	0,4077	0,5302	0,0327	
CWB EU	0,3944	0,7913	1	0,0388	0,6338	0,2480	0,7283	
CWB M	0,8399	0,5780	1	0,6855	0,5846	1	1	
Am. Total	ajustada*	aj. + CWB	ajustada*	ajustada	tot. + CWB	tot. + CWB	aj. + CWB	
BCMA	rs12926535	rs13332630	rs3743591	rs1126889	rs12597429			
EU e M (C)	0,8819	1	1	0,3630	0,3615			
EU e M (P)	0,5396	0,1244	0,0212**	0,7133	0,6432			
CWB EU	0,0021	0,2497	0,0047	1	0,9281			
CWB M	0,1342	0,6961	0,1328	0,3218	0,3218			
Am. Total	total	tot. + CWB	ajustada	Total	tot. + CWB			
TWEAK+APRIL	rs12940684	rs57851931	rs12937543	rs75016989	rs9907657	rs55725943	rs116109941	
EU e M (C)	0,2175	0,0241	0,0031	0,7272	0,0058	1	0,6077	
EU e M (P)	0,3888	0,0335	0,0035	0,0633**	0,4077	0,8516	0,0382	
CWB EU	0,1081	0,2108	0,0822	0,0011**	0,1471	0,3593	0,7195	
CWB M	0,5437	0,8200	0,5531	0,6515	0,1293	0,5230	0,3319	
Am. Total	total	aj. + CWB	ajustada	ajustada	aj. + CWB	tot. + CWB	aj. + CWB	
TWEAK+APRIL	rs4246413	rs11552708	rs3803800	rs6608				
EU e M (C)	0,0090	0,1133	0,0026	0,4769				
EU e M (P)	0,1837	0,8818	0,0953	1				
CWB EU	0,8661	0,4131	0,0746	0,3144				
CWB M	0,3279	0,3308	0,7090	1				
Am. Total	aj. + CWB	tot. + CWB	ajustada	tot. + CWB				
TACI	rs34562254	rs17793572	rs4792800	rs12938073	rs12603708	rs4561508	rs11651242	
EU e M (C)	0,6238	0,1118	0,7473	0,4788	0,5793	0,2852	1	
EU e M (P)	0,8954	0,4909	0,7899	1	1	0,8820	1	
CWB EU	0,9015	0,5113	0,0449	0,5341	0,0747	0,6120	0,7210	
CWB M	1	1	0,7034	0,5779	0,3814	1	1	
Am. Total	tot. + CWB	tot. + CWB	total	tot. + CWB	total	tot. + CWB	tot. + CWB	
TACI	rs7216399	rs8082017	rs11078360	rs7226097	rs6416870	rs9893198		
EU e M (C)	0,5765	0,2640	0,3330	0,5617	0,0117	0,1291		
EU e M (P)	0,5776	0,8761	0,8759	0,5736	0,7164	0,6161		
CWB EU	0,6030	0,2502	0,2685	0,4702	0,3683	0,8744		
CWB M	0,6079	0,5029	0,7438	0,2492	0,7702	0,8207		
Am. Total	tot. + CWB	tot. + CWB	tot. + CWB	tot. + CWB	ajustada	total		
BAFFR	rs7290134	rs5996087	rs55898132	rs73165134	rs77874543	rs5996088	rs12158335	
EU e M (C)	0,0345	0,1176	0,6523	0,6522	0,3351	0,6137	0,0320**	
EU e M (P)	0,0044	0,0300	0,2553	1	1	0,0220	0,0234	
CWB EU	0,0084	0,8974	0,1015	0,3953	0,5777	0,8913	<0,0001	
CWB M	0,8196	0,7409	0,6080	0,6009	0,1561	1	0,2318	
Am. Total	ajustada	aj. + CWB	tot. + CWB	tot. + CWB	tot. + CWB	aj. + CWB	ajustada	

Valores de P para as comparações de frequências alélicas entre os subgrupos de indivíduos com ancestralidade predominantemente europeia (EU) e de indivíduos com ancestralidade mestiça africana e europeia (M), para as amostras de controles (C) e de pacientes (P). Em negrito os valores considerados significativos. Amostra total (Am. Total) para o estudo de associação: soma dos subgrupos EU e M (total); soma dos subgrupos EU e M e da população de Curitiba (tot. + CWB); com ajuste de proporções entre EU e M em pacientes e controles (ajustada); com ajuste e acrescentando as amostras da população de Curitiba (aj. + CWB). *nestes casos a população de Curitiba (CWB) não foi incluída por apresentar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg; **nestes casos, estão mostrados valores de P para a comparação de frequências genotípicas, pois houve resultados significativos apenas nesta comparação.

Nas tabelas 7 a 11 estão mostrados os resultados dos estudos de associação para cada gene. Polimorfismos dos genes *BAFF*, *BCMA*, *TWEAK/APRIL* e *TACI* estão associados ao PFE. No caso de *BAFF* (Tabela 7), dois SNPs apresentaram diferenças significativas entre pacientes e controles: rs11069727, localizado no íntron 2 e rs4421862 (Figura 11), localizado no íntron 3, sendo que para o primeiro o valor de *P* foi muito próximo ao limiar de significância e pode ter sido observado ao acaso. Em ambos a associação aparece somente no subgrupo M, sendo que o subgrupo EU tem tendências de associação no sentido oposto.

Para *BCMA* (Tabela 8), o SNP rs13332630, localizado na região promotora, apresentou diferenças significativas na amostra total (Figura 12). No caso de *TWEAK/APRIL* (Tabela 9), o SNP rs11552708, localizado em um exon de *APRIL*, apresentou resultados significativos para o subgrupo M e também para a amostra total (Figura 13). Para o gene *TACI* (Tabela 10), rs12938073, localizado no íntron 3, apresentou associação com susceptibilidade diferencial ao PFE também na análise da amostra total e do subgrupo M (Figura 14). O gene *BAFFR* (Tabela 11) não apresentou nenhum SNP associado.

Outros SNPs apresentaram valores próximos ao limiar de significância nas comparações entre pacientes de PFE e controles. Considerando o fato de que os valores de *P* não foram corrigidos para comparações múltiplas, estes valores próximos ao limiar de significância provavelmente não representam associações.

A análise de regressão logística foi feita incluindo os SNPs rs11069727, rs4421862 (*BAFF*), rs13332630 (*BCMA*), rs57851931 (*TWEAK*), rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*). Os únicos resultados significativos (Tabela 12) foram para os SNPs rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*). Ouve uma influência significativa da etnia, da escolaridade e do local de residência (Tabela 12).

Dois casos interessantes foram observados em SNPs do gene *BAFF*. O primeiro foi para os SNPs rs7993590, rs11069727, rs4421862 e rs4145212, para os quais houve diferença significativa entre os subgrupos EU e M apenas na comparação entre pacientes (Tabela 6). Além disso, para dois destes SNPs, rs11069727 e rs4421862, os subgrupos EU e M apresentaram OR em sentidos opostos (Tabela 7). O segundo caso interessante foi para os SNPs rs9514827, rs9514828, rs7991543 e rs9520829, os quais apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weiberg apenas na amostra de pacientes (Tabela 7). Para os quatro marcadores, o desvio observado foi devido, principalmente, à

uma falta de heterozigotos e nenhum destes SNPs se apresentou significativamente associado à susceptibilidade diferencial ao PF. Para estes SNPs, além das análises de associação explicadas no item 4.1.4, análises adicionais de associação foram realizadas. Foram comparadas as frequências genotípicas, utilizando-se tabelas 2x3 e também foram comparadas as frequência de heterozigotos com a dos dois homozigotos somados (Tabela 13), para verificar se poderia haver um efeito de sobredominância, com o genótipo heterozigoto tendo um efeito diferente dos homozigotos, mas nenhuma associação foi observada.

Para os dois casos mencionados acima, assim como para SNPs associados com PF localizados no mesmo gene (rs57851931 e rs11552708, *TWEPRIL*) ou no mesmo cromossomo (rs11552708 - *APRIL* - e rs12938073 - *TACI*), foi feita a análise de associação com haplótipos e foi calculado o desequilíbrio de ligação (Tabela 14). As associações observadas com haplótipos parecem apenas refletir as associações individuais dos SNPs compondo o haplótipo. No subgrupo EU, foi observado um valor significativo para o haplótipo TC dos SNPs rs9514827 e rs9520829 do gene *BAFF*, porém, este valor está muito próximo ao limiar de significância e pode ter sido observado ao acaso.

Também foi feita análise de interação entre os genótipos de SNPs associados, na qual a amostra foi estratificada pelos genótipos de um SNP e a associação foi verificada em cada estrato para um segundo SNP (Tabelas 15 a 20). Nesta análise, foi possível perceber que o efeito do SNP rs4421862 de *BAFF* é realmente diferente no subgrupo M, pois as associações de outros SNPs, em especial rs1152708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*), aparecem em estratos diferentes de rs4421862 (*BAFF*) dependendo do subgrupo analisado (Tabelas 16 e 17). Nem sempre a associação em estratos diferentes pode ser explicada pelo número amostral nos respectivos estratos. Por exemplo, a susceptibilidade aumentada de indivíduos portadores do alelo A no SNP rs12938073 (*TACI*) foi observada no estrato portador do alelo A de rs4421862 (*BAFF*) no subgrupo EU, mas no estrato portador do alelo G de rs4421862 (*BAFF*) no subgrupo M, mesmo este segundo estrato tendo maior número amostral em ambos os subgrupos.

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFF*.

rs9514827	EU						M						Amostra Total								
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)		(n=182)					(n=70)		(n=112)					(n=211)		(n=262)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	53,2	84	59,3	108				62,9	44	67,0	75				56,9	120	61,5	161			
TC	38,0	60	29,1	53	0,69	0,43 - 1,10	0,1238	37,1	26	31,3	35	0,79	0,42 - 1,48	0,5192	37,9	80	30,2	79	0,74	0,50 - 1,09	0,1354
CC	8,9	14	11,5	21	1,17	0,56 - 2,43	0,7145			1,8	2	NC	NC	NC	5,2	11	8,4	22	1,49	0,70 - 3,19	0,3535
T	72,2	228	73,9	269				81,4	114	82,6	185				75,8	320	76,5	401			
C	27,8	88	26,1	95	0,92	0,65 - 1,28	0,6648	18,6	26	17,4	39	0,92	0,53 - 1,60	0,8883	24,2	102	23,5	123	0,96	0,71 - 1,30	0,8180
HW	0,4892		0,0009																		
rs3759467	EU						M						Amostra Total								
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=157)		(n=188)					(n=71)		(n=115)					(n=235)		(n=329)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	62,4	98	63,3	119				59,2	42	53,9	62				60,9	143	59,9	197			
GA	33,1	52	29,8	56	0,89	0,56 - 1,41	0,6378	32,4	23	40,0	46	1,36	0,72 - 2,56	0,4232	33,6	79	33,7	111	1,02	0,71 - 1,46	0,9271
GG	4,5	7	6,9	13	1,53	0,59 - 3,98	0,4828	8,5	6	6,1	7	0,79	0,25 - 2,52	0,7687	5,5	13	6,4	21	1,17	0,57 - 2,42	0,7183
A	79,0	248	78,2	294				75,4	107	73,9	170				77,7	365	76,7	505			
G	21,0	66	21,8	82	1,05	0,73 - 1,51	0,8524	24,6	35	26,1	60	1,08	0,67 - 1,75	0,8072	22,3	105	23,3	153	1,05	0,79 - 1,40	0,7184
HW	0,9756		0,0826																		
rs9514828	EU						M						Amostra Total								
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=155)		(n=189)					(n=69)		(n=116)					(n=201)		(n=289)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CC	37,4	58	40,7	77				53,6	37	55,2	64				45,3	91	47,1	136			
TC	49,0	76	39,7	75	0,74	0,47 - 1,19	0,2361	40,6	28	42,2	49	1,01	0,55 - 1,87	1	44,3	89	40,1	116	0,87	0,59 - 1,28	0,4954
TT	13,5	21	19,6	37	1,33	0,70 - 2,50	0,4268	5,8	4	2,6	3	0,43	0,09 - 2,04	0,4230	10,4	21	12,8	37	1,18	0,65 - 2,14	0,6526
C	61,9	192	60,6	229				73,9	102	76,3	177				67,4	271	67,1	388			
T	38,1	118	39,4	149	1,06	0,78 - 1,44	0,7533	26,1	36	23,7	55	0,88	0,54 - 1,43	0,6193	32,6	131	32,9	190	1,01	0,77 - 1,33	0,9449
HW	0,6194		0,0201																		

continua

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFF*.

															continuação						
rs3759465	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=157)		(n=189)					(n=71)		(n=115)					(n=428)		(n=333)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	87,9	138	82,5	156				85,9	61	88,7	102				88,1	377	84,7	282			
AG	12,1	19	16,9	32	1,49	0,81 - 2,75	0,2248	12,7	9	10,4	12	0,80	0,32 - 2,00	0,6398	11,7	50	14,4	48	1,28	0,84 - 1,96	0,2754
GG			0,5	1	NC	NC	NC	1,4	1	0,9	1	NC	NC	NC	0,2	1	0,9	3	4,01	0,42 - 38,76	0,3196
A	93,9	295	91,0	344				92,3	131	93,9	216				93,9	804	91,9	612			
G	6,1	19	9,0	34	1,53	0,86 - 2,75	0,1541	7,7	11	6,1	14	0,77	0,34 - 1,75	0,6706	6,1	52	8,1	54	1,36	0,92 - 2,03	0,1221
HW	0,4197		0,6382					0,3405		0,3492					0,6235		0,5509				
rs7991543	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=151)		(n=175)					(n=69)		(n=107)					(n=416)		(n=305)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	37,7	57	42,9	75				33,3	23	32,7	35				34,6	144	39,3	120			
AT	49,0	74	40,6	71	0,73	0,45 - 1,17	0,2283	53,6	37	46,7	50	0,89	0,45 - 1,75	0,8635	49,3	205	42,0	128	0,75	0,54 - 1,04	0,0945
AA	13,2	20	16,6	29	1,10	0,57 - 2,14	0,8661	13,0	9	20,6	22	1,61	0,63 - 4,10	0,3615	16,1	67	18,7	57	1,02	0,67 - 1,57	1
T	62,3	188	63,1	221				60,1	83	56,1	120				59,3	493	60,3	368			
A	37,7	114	36,9	129	0,96	0,70 - 1,32	0,8710	39,9	55	43,9	94	1,18	0,77 - 1,83	0,5076	40,7	339	39,7	242	0,96	0,77 - 1,18	0,6801
TT+AT	86,7	131	83,5	146	0,77	0,41 - 1,42	0,4397	86,9	60	79,4	85	0,58	0,25 - 1,35	0,2291	83,9	349	81,3	248	0,84	0,57 - 1,23	0,3704
AA+AT	62,2	94	57,2	100	0,81	0,52 - 1,26	0,3671	66,6	46	67,3	72	1,03	0,54 - 1,96	1	65,4	272	60,7	185	0,82	0,60 - 1,11	0,2108
HW	0,5994		0,0895					0,3249		0,5948					0,6752		0,0314				
rs9520829	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=160)		(n=191)					(n=71)		(n=114)					(n=211)		(n=271)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	58,8	94	62,8	120				70,4	50	71,1	81				63,5	134	65,3	177			
CG	35,0	56	26,7	51	0,71	0,45 - 1,14	0,1917	28,2	20	27,2	31	0,96	0,49 - 1,86	1	32,2	68	27,3	74	0,82	0,55 - 1,23	0,3601
CC	6,3	10	10,5	20	1,57	0,70 - 3,51	0,3267	1,4	1	1,8	2	NC	NC	NC	4,3	9	7,4	20	1,68	0,74 - 3,81	0,2417
G	76,3	244	76,2	291				84,5	120	84,6	193				79,6	336	79,0	428			
C	23,8	76	23,8	91	1,00	0,71- 1,42	1	15,5	22	15,4	35	0,99	0,55 - 1,77	1	20,4	86	21,0	114	1,04	0,76 - 1,42	0,8108
HW	0,6704		0,0003					0,5232		0,6208					0,9199		0,0034				
															continua						

continua

Tabela 7. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFF*.

rs1409444	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)		(n=189)					(n=70)		(n=115)					(n=427)		(n=333)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	55,7	88	60,8	115				65,7	46	59,1	68				60,4	258	58,9	196			
CT	39,2	62	33,3	63	0,78	0,50 - 1,22	0,3047	28,6	20	33,0	38	1,29	0,67 - 2,48	0,5091	35,4	151	33,9	113	0,99	0,73 - 1,34	0,9378
CC	5,1	8	5,8	11	1,05	0,41 - 2,73	1	5,7	4	7,8	9	1,52	0,44 - 5,24	0,5647	4,2	18	7,2	24	1,76	0,93 - 3,32	0,1038
T	75,3	238	77,5	293				80,0	112	75,7	174				78,1	667	75,8	505			
C	24,7	78	22,5	85	0,89	0,62 - 1,26	0,5295	20,0	28	24,3	56	1,29	0,77 - 2,15	0,3716	21,9	187	24,2	161	1,14	0,89 - 1,45	0,2943
HW	0,4864		0,547					0,37		0,2692					0,484		0,1747				
rs8181791	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)		(n=192)					(n=71)		(n=115)					(n=236)		(n=335)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	36,7	58	36,5	70				42,3	30	44,3	51				38,6	91	39,1	131			
GA	48,7	77	51,0	98	1,05	0,67 - 1,67	0,9069	42,3	30	46,1	53	1,04	0,55 - 1,96	1	47,0	111	49,6	166	1,04	0,73 - 1,49	0,8547
GG	14,6	23	12,5	24	0,86	0,44 - 1,69	0,7334	15,5	11	9,6	11	0,59	0,23 - 1,52	0,3287	14,4	34	11,3	38	0,78	0,46 - 1,32	0,4107
A	61,1	193	62,0	238				63,4	90	67,4	155				62,1	293	63,9	428			
G	38,9	123	38,0	146	0,96	0,71 - 1,31	0,8152	36,6	52	32,6	75	0,84	0,54 - 1,30	0,4332	37,9	179	36,1	242	0,93	0,73 - 1,18	0,5323
HW	0,7535		0,2501					0,4495		0,6022					0,9871		0,1768				
rs7993590	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=154)		(n=186)					(n=69)		(n=115)					(n=207)		(n=267)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	50,6	78	43,0	80				46,4	32	55,7	64				48,3	100,0	47,6	127			
AT	41,6	64	43,5	81	1,23	0,78 - 1,94	0,4200	46,4	32	40,0	46	0,72	0,39 - 1,34	0,3438	43,0	89	42,3	113	1,00	0,68 - 1,46	1
TT	7,8	12	13,4	25	2,03	0,95 - 4,32	0,0693	7,2	5	4,3	5	0,50	0,13 - 1,85	0,3134	8,7	18	10,1	27	1,18	0,62 - 2,27	0,6267
A	71,4	220	64,8	241				69,6	96	75,7	174				69,8	289	68,7	367			
T	28,6	88	35,2	131	1,36	0,98 - 1,88	0,0700	30,4	42	24,3	56	0,74	0,46 - 1,18	0,2237	30,2	125	31,3	167	1,05	0,80 - 1,39	0,7236
AA+AT	92,2	142	86,5	161	0,54	0,26 - 1,12	0,1158	92,8	64	95,7	110	1,72	0,48 - 6,17	0,5053	91,3	189	89,9	240	0,85	0,45 - 1,58	0,6386
TT+AT	49,4	76	56,9	106	1,36	0,89 - 2,09	0,1899	53,6	37	44,3	51	0,69	0,38 - 1,26	0,2860	51,7	107	52,4	140	1,03	0,72 - 1,48	0,9262
HW	0,8215		0,5342					0,4289		0,3575					0,774		0,8007				

continua

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFF*.

												continuação				
rs11069727	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=159)		(n=191)					(n=71)		(n=115)						
	%	n	%	n				%	n	%	n					
AA	52,2	83	44,0	84				45,1	32	60,0	69					
AG	39,6	63	42,9	82	1,29	0,82 - 2,01	0,3063	47,9	34	37,4	43	0,59	0,32 - 1,08	0,1170		
GG	8,2	13	13,1	25	1,90	0,91 - 3,97	0,1052	7,0	5	2,6	3	0,28	0,06 - 1,24	0,1176		
A	72,0	229	65,4	250				69,0	98	78,7	181					
G	28,0	89	34,6	132	1,36	0,98 - 1,88	0,0723	31,0	44	21,3	49	0,60	0,37 - 0,97	0,0482		
AA+AG	91,8	146	86,9	166	0,59	0,29 - 1,20	0,1684	93,0	66	97,4	112	2,83	0,65 - 12,22	0,2629		
GG+AG	47,8	76	56,0	107	1,39	0,91 - 2,12	0,1335	54,9	39	40,0	46	0,55	0,30 - 0,99	0,0506		
HW	0,83		0,4827					0,3133		0,217						
rs4421862	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=156)		(n=186)					(n=70)		(n=115)						
	%	n	%	n				%	n	%	n					
GG	44,9	70	37,1	69				34,3	24	53,9	62					
GA	45,5	71	47,8	89	1,27	0,81 - 2,01	0,3529	54,3	38	38,3	44	0,45	0,24 - 0,85	0,0165		
AA	9,6	15	15,1	28	1,89	0,93 - 3,85	0,0828	11,4	8	7,8	9	0,44	0,15 - 1,26	0,1528		
G	67,6	211	61,0	227				61,4	86	73,0	168					
A	32,4	101	39,0	145	1,33	0,97 - 1,83	0,0787	38,6	54	27,0	62	0,59	0,38 - 0,92	0,0212		
GG+GA	90,4	141	84,9	158	0,60	0,31 - 1,17	0,1432	88,6	62	92,2	106	1,52	0,56 - 4,14	0,4393		
AA+GA	55,1	86	62,9	117	1,38	0,89 - 2,13	0,1523	65,7	46	46,1	53	0,45	0,24 - 0,82	0,0102		
HW	0,6221		0,9363					0,2233		0,7606						
rs4145213	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=150)		(n=188)					(n=70)		(n=114)						
	%	n	%	n				%	n	%	n					
GG	43,3	65	38,8	73				52,9	37	43,0	49					
GT	29,3	44	42,0	79	NC	NC	NC	31,4	22	36,0	41	NC	NC	NC		
TT	27,3	41	19,1	36	NC	NC	NC	15,7	11	21,1	24	NC	NC	NC		
G	58,0	174	59,8	225				68,6	96	61,0	139					
T	42,0	126	40,2	151	NC	NC	NC	31,4	44	39,0	89	NC	NC	NC		
HW	0,000		0,0848					0,0235		0,0091						

continua

Tabela 7. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFF*.

															conclusão						
rs116898958	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)	(n=189)	(n=71)	(n=116)				(n=427)	(n=333)												
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CC	93,7	148	96,3	182				95,8	68	94,0	109				94,6	404	95,2	317			
TC	6,3	10	3,7	7	0,57	0,21 - 1,53	0,3207	4,2	3	6,0	7	1,46	0,36 - 5,82	0,7444	5,4	23	4,8	16	0,89	0,46 - 1,71	0,7437
TT																					
C	96,8	306	98,1	371				97,9	139	97,0	225				97,3	831	97,6	650			
T	3,2	10	1,9	7	0,58	0,21 - 1,53	0,3207	2,1	3	3,0	7	1,44	0,37 - 5,67	0,7480	2,7	23	2,4	16	0,89	0,47 - 1,70	0,7184
HW	0,6812							0,8557		0,7376					0,5674		0,6533				
rs185198828	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=157)	(n=178)	(n=68)	(n=107)				(n=405)	(n=309)												
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	98,7	155	98,9	176				100,0	68	100,0	107				99,5	403	99,4	307			
GT	1,3	2	1,1	2	NC	NC	NC								0,5	2	0,6	2	NC	NC	NC
TT																					
G	99,4	312	99,4	354				100,0	136	100,0	214				99,8	808	99,7	616			
T	0,6	2	0,6	2	NC	NC	NC								0,2	2	0,3	2	NC	NC	NC
HW	NC		NC					NC		NC					NC		NC				
rs4145212	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=156)	(n=187)	(n=70)	(n=114)				(n=204)	(n=286)												
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	53,2	83	54,5	102				60,0	42	68,4	78				55,9	114	59,8	171			
AT	39,1	61	41,2	77	1,03	0,66 - 1,60	0,9105	34,3	24	28,9	33	0,74	0,39 - 1,41	0,4070	37,3	76	36,7	105	0,92	0,63 - 1,34	0,6994
AA	7,7	12	4,3	8	0,54	0,21 - 1,39	0,2407	5,7	4	2,6	3	0,40	0,09 - 1,89	0,4206	6,9	14	3,5	10	0,48	0,20 - 1,11	0,0880
T	72,8	227	75,1	281				77,1	108	82,9	189				74,5	304	78,1	447			
A	27,2	85	24,9	93	0,88	0,63 - 1,24	0,4855	22,9	32	17,1	39	0,70	0,41 - 1,18	0,2205	25,5	104	21,9	125	0,82	0,61 - 1,10	0,1935
TT+AT	92,3	144	95,7	179	1,86	0,74 - 4,68	0,2471	94,3	66	97,3	111	2,24	0,49 - 10,33	0,4297	93,2	190	96,5	276	2,03	0,88 - 4,67	0,0943
AA+AT	46,8	73	45,5	85	0,95	0,62 - 1,45	0,8283	40,0	28	31,5	36	0,69	0,37 - 1,29	0,2670	44,2	90	40,2	115	0,85	0,59 - 1,23	0,4041
HW	0,8648		0,1632					0,8162		0,8246					0,7836		0,2053				

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos, genótipos, ou de alelos; % - porcentagem de indivíduos, genótipos, ou alelos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; P - valor de *P* na comparação das frequências; HW - valor de *P* para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg; NC - não calculado. *Valor de *P* com correção de Yates. Em negrito estão destacados os valores de P e OR significativos.

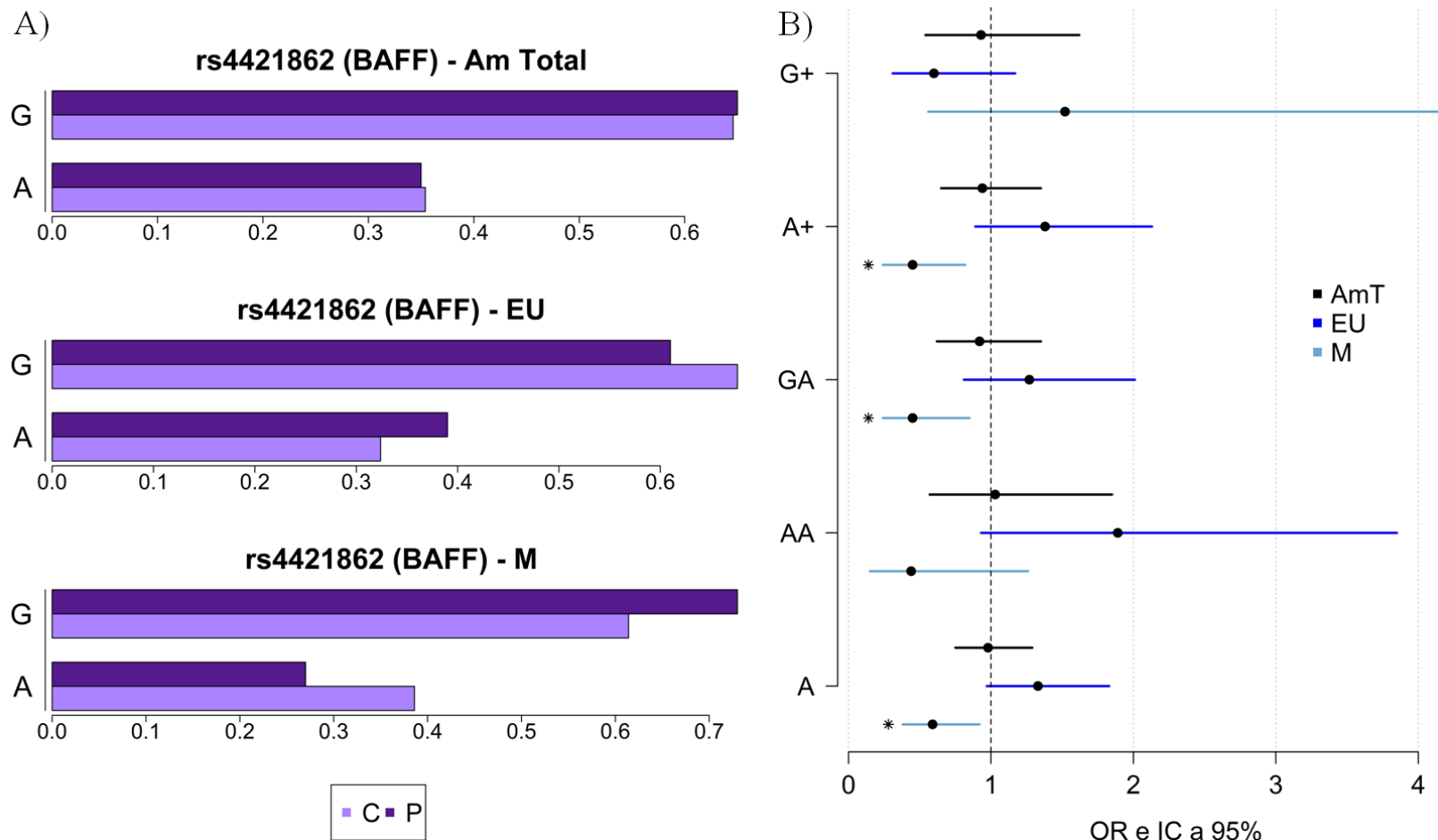


Figura 11. Frequências alélicas e valores de OR, IC e *P* para rs4421862 (BAFF). A) Frequências alélicas. Am Total: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C: controles; P: pacientes. B) Os pontos indicam os valores de *odds ratio* (OR), as barras indica os intervalos de confiança (IC); Am T: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; *: valor de *P* menor que 0,05.

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BCMA*.

rs12926535	EU							M							Amostra Total						
	C (n=157)		P (n=188)		OR	IC	P	C (n=72)		P (n=116)		OR	IC	P	C (n=237)		P (n=332)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	75,8	119	72,9	137				77,8	56	79,3	92				76,8	182	72,9	242			
AG	21,7	34	26,1	49	1,25	0,76 - 2,07	0,4465	19,4	14	17,2	20	0,87	0,41 - 1,86	0,8453	20,7	49	25,0	83	1,27	0,85 - 1,90	0,2662
AA	2,5	4	1,1	2	0,43	0,08 - 2,41	0,4240	2,8	2	3,4	4	1,22	0,22 - 6,86	1	2,5	6	2,1	7	0,88	0,29 - 2,66	1
G	86,6	272	85,9	323				87,5	126	87,9	204				87,1	413	85,4	567			
A	13,4	42	14,1	53	1,06	0,69 - 1,64	0,8249	12,5	18	12,1	28	0,96	0,51 - 1,81	1	12,9	61	14,6	97	1,16	0,82 - 1,63	0,4028
HW	0,412		0,2959					0,3458		0,0432					0,2294		0,9701				
rs13332630	EU							M							Amostra Total						
	C (n=160)		P (n=188)		OR	IC	P	C (n=72)		P (n=116)		OR	IC	P	C (n=427)		P (n=332)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	83,1	133	85,1	160				81,9	59	91,4	106				80,8	345	88,0	292			
CA	16,3	26	14,4	27	0,86	0,48 - 1,55	0,6551	18,1	13	8,6	10	0,43	0,18 - 1,04	0,0678	18,5	79	11,7	39	0,58	0,39 - 0,88	0,0114
CC	0,6	1	0,5	1	NC	NC	NC								0,7	1	0,3	1	NC	NC	NC
A	91,3	292	92,3	347				91,0	131	95,7	222				90,0	769	93,8	623			
C	8,8	28	7,7	29	0,87	0,51 - 1,50	0,6780	9,0	13	4,3	10	0,45	0,19 - 1,06	0,0771	10,0	85	6,2	41	0,60	0,40 - 0,88	0,0081
AA+CA	99,4	159	99,5	187	NC	NC	NC	100,0	72	100,0	116	NC	NC	NC	99,3	424	99,7	331	NC	NC	NC
CC+CA	16,9	27	14,9	28	0,86	0,48 - 1,53	0,6595	18,1	13	8,6	10	0,43	0,18 - 1,04	0,0678	19,2	80	12,0	40	0,59	0,39 - 0,89	0,0121
HW	0,8237		0,9035					0,3998		0,6276					0,5066		0,8012				
rs3743591	EU							M							Amostra Total						
	C (n=155)		P (n=184)		OR	IC	P	C (n=71)		P (n=114)		OR	IC	P	C (n=210)		P (n=264)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	76,1	118	73,4	135				76,1	54	80,7	92				75,2	158	75,8	200			
AG	21,3	33	25,5	47	1,24	0,75 - 2,07	0,4406	21,1	15	14,9	17	0,67	0,31 - 1,44	0,3213	22,4	47	21,6	57	0,96	0,62 - 1,49	0,9108
GG	2,6	4	1,1	2	0,44	0,08 - 2,43	0,4249	2,8	2	4,4	5	1,47	0,28 - 7,83	0,7165	2,4	5	2,7	7	1,11	0,34 - 3,55	1
A	86,8	269	86,1	317				86,6	123	88,2	201				86,4	363	86,6	457			
G	13,2	41	13,9	51	1,06	0,68 - 1,64	0,8230	13,4	19	11,8	27	0,87	0,46 - 1,63	0,7463	13,6	57	13,4	71	0,99	0,68 - 1,44	1
HW	0,3671		0,3435					0,4555		0,0899*					0,5054		0,2391				

continua

Tabela 8. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BCMA*.

															conclusão							
rs1126889	EU							M							Amostra Total							
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
	(n=160)		(n=188)					(n=72)		(n=116)					(n=239)		(n=332)					
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n				
CC	57,5	92	52,1	98				50,0	36	46,6	54				55,2	132	52,1	173				
CG	35,0	56	38,8	73	1,22	0,78 - 1,92	0,4237	41,7	30	46,6	54	1,20	0,65 - 2,22	0,6396	36,4	87	40,4	134	1,18	0,83 - 1,67	0,3722	
GG	7,5	12	9,0	17	1,33	0,60 - 2,94	0,5518	8,3	6	6,9	8	0,89	0,28 - 2,78	1	8,4	20	7,5	25	0,95	0,51 - 1,79	1	
C	75,0	240	71,5	269				70,8	102	69,8	162				73,4	351	72,3	480				
G	25,0	80	28,5	107	1,19	0,85 - 1,67	0,3454	29,2	42	30,2	70	1,05	0,67 - 1,66	0,9078	26,6	127	27,7	184	1,06	0,81 - 1,38	0,6714	
HW	0,3991		0,5248					0,9432		0,2592					0,2996		0,8923					
rs12597429	EU							M							Amostra Total							
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
	(n=156)		(n=186)					(n=72)		(n=115)					(n=420)		(n=329)					
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n				
TT	57,1	89	52,2	97				50,0	36	47,0	54				54,5	229	52,3	172				
CT	35,9	56	39,8	74	1,21	0,77 - 1,90	0,4236	41,7	30	46,1	53	1,18	0,64 - 2,18	0,6405	37,1	156	40,7	134	1,14	0,84 - 1,55	0,3944	
CC	7,1	11	8,1	15	1,25	0,55 - 2,87	0,6773	8,3	6	7,0	8	0,89	0,28 - 2,78	1	8,3	35	7,0	23	0,87	0,50 - 1,53	0,6723	
T	75,0	234	72,0	268				70,8	102	70,0	161				73,1	614	72,6	478				
C	25,0	78	28,0	104	1,16	0,83 - 1,64	0,3869	29,2	42	30,0	69	1,04	0,66 - 1,64	0,9077	26,9	226	27,4	180	1,02	0,81 - 1,29	0,8415	
HW	0,5935		0,8663					0,9432		0,2967					0,254		0,6531					

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos, genótipos, ou de alelos; % - porcentagem de indivíduos, genótipos, ou alelos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; *P* - valor de *P* na comparação das frequências; HW - valor de *P* para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg; NC - não calculado. *Valor de *P* com correção de Yates. Em negrito estão destacados os valores de *P* e OR significativos.

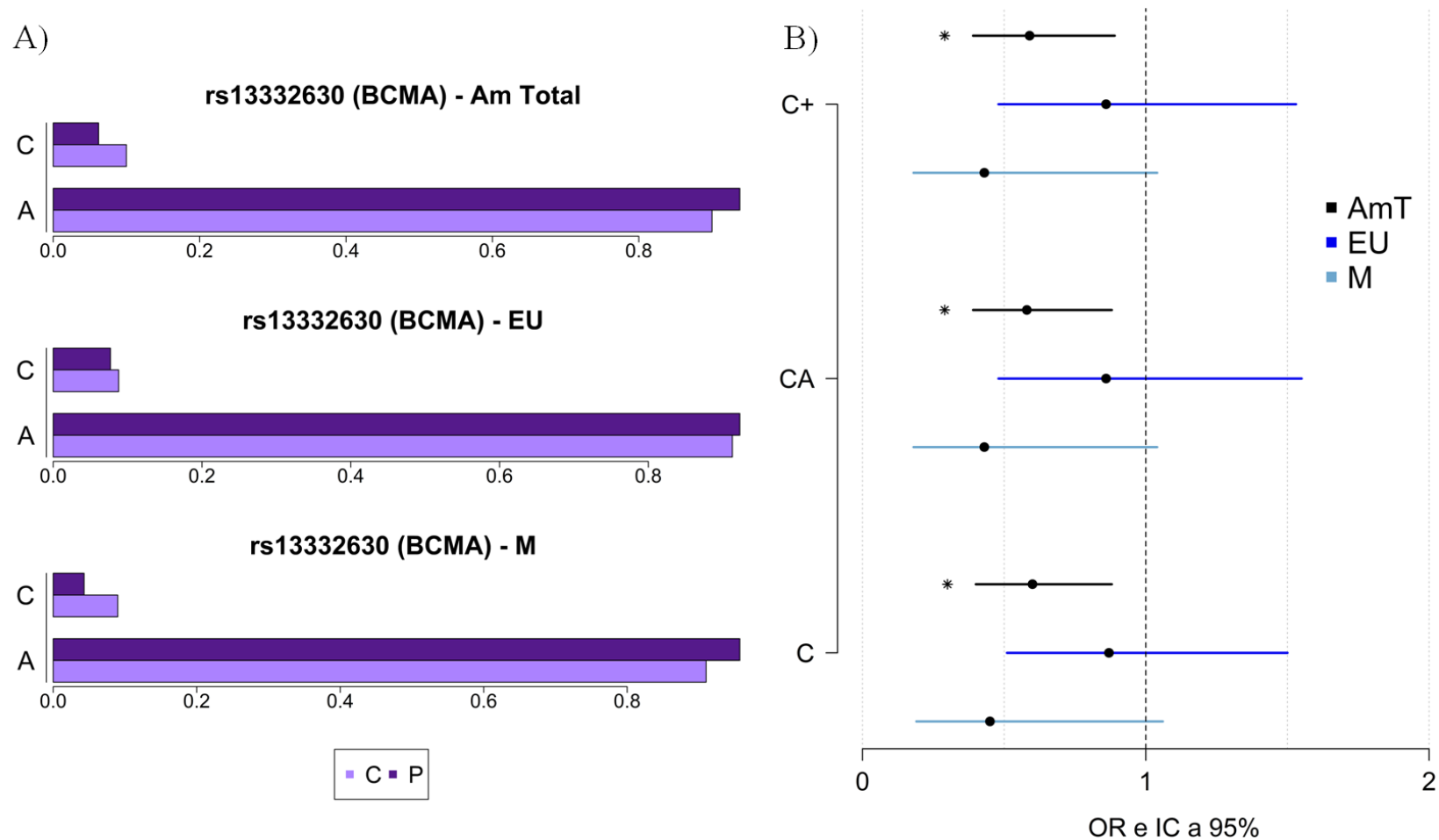


Figura 12. Frequências alélicas e valores de OR, IC e P para rs13332630 (BCMA). A) Frequências alélicas. Am Total: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C: controles; P: pacientes. B) Os pontos indicam os valores de *odds ratio* (OR), as barras indica os intervalos de confiança (IC); Am T: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; *: valor de P menor que 0,05.

Tabela 9. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs dos genes *TWEAK* e *APRIL*.

rs12940684	EU						M						Amostra Total								
	C (n=156)		P (n=177)		OR	IC	P	C (n=71)		P (n=110)		OR	IC	P	C (n=234)		P (n=305)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	37,8	59	32,8	58				31,0	22	29,1	32				35,5	83	32,5	99			
TC	46,8	73	49,2	87	1,21	0,75 - 1,95	0,4659	47,9	34	49,1	54	1,09	0,55 - 2,18	0,8604	47,4	111	48,2	147	1,11	0,76 - 1,63	0,6264
CC	15,4	24	18,1	32	1,36	0,71 - 2,58	0,4167	21,1	15	21,8	24	1,10	0,47 - 2,56	0,8340	17,1	40	19,3	59	1,24	0,75 - 2,03	0,4507
T	61,2	191	57,3	203				54,9	78	53,6	118				59,2	277	56,6	345			
C	38,8	121	42,7	151	1,17	0,86 - 1,60	0,3432	45,1	64	46,4	102	1,05	0,69 - 1,61	0,8296	40,8	191	43,4	265	1,11	0,87 - 1,42	0,3865
HW	0,8563		0,9498					0,7819		0,8919					0,7816		0,7374				
rs57851931	EU						M						Amostra Total								
	C (n=159)		P (n=189)		OR	IC	P	C (n=71)		P (n=116)		OR	IC	P	C (n=206)		P (n=289)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	77,4	123	75,7	143				62,0	44	65,5	76				71,8	148	72,3	209			
GA	20,8	33	20,6	39	1,02	0,60 - 1,71	1	35,2	25	27,6	32	0,74	0,39 - 1,41	0,4106	26,7	55	22,5	65	0,84	0,55 - 1,27	0,4552
GG	1,9	3	3,7	7	2,01	0,51 - 7,93	0,3537	2,8	2	6,9	8	2,32	0,47 - 11,39	0,3341	1,5	3	5,2	15	3,54	1,01 - 12,45	0,0472
A	87,7	279	86,0	325				79,6	113	79,3	184				85,2	351	83,6	483			
G	12,3	39	14,0	53	1,17	0,75 - 1,82	0,5031	20,4	29	20,7	48	1,02	0,61 - 1,70	1	14,8	61	16,4	95	1,13	0,80 - 1,61	0,5359
AA+GA	98,2	156	96,3	182	0,50	0,13 - 1,97	0,3552	97,2	69	93,1	108	0,39	0,08 - 1,90	0,3231	98,5	203	94,8	274	0,27	0,08 - 0,94	0,0483
GG+GA	22,7	36	24,3	46	1,10	0,67 - 1,81	0,8000	38,0	27	34,5	40	0,86	0,46 - 1,58	0,6403	28,2	58	27,7	80	0,98	0,66 - 1,45	0,9193
HW	0,6538		0,0859*					0,4827		0,0860					0,4024		0,0021				
rs12937543	EU						M						Amostra Total								
	C (n=157)		P (n=181)		OR	IC	P	C (n=71)		P (n=114)		OR	IC	P	C (n=211)		P (n=263)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	26,1	41	28,7	52				46,5	33	45,6	52				34,1	72	35,4	93			
AT	48,4	76	51,4	93	0,96	0,58 - 1,61	0,8975	38,0	27	42,1	48	1,13	0,59 - 2,14	0,7456	44,5	94	49,0	129	1,06	0,71 - 1,60	0,8356
TT	25,5	40	19,9	36	0,71	0,39 - 1,30	0,2828	15,5	11	12,3	14	0,81	0,33 - 1,99	0,8168	21,3	45	15,6	41	0,71	0,42 - 1,19	0,2303
A	50,3	158	54,4	197				65,5	93	66,7	152				56,4	238	59,9	315			
T	49,7	156	45,6	165	0,85	0,63 - 1,15	0,3155	34,5	49	33,3	76	0,95	0,61 - 1,48	0,8221	43,6	184	40,1	211	0,87	0,67 - 1,12	0,2894
HW	0,6902		0,6308					0,1813		0,5741					0,1713		0,7347				

continua

Tabela 9. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs dos genes *TWEAK* e *APRIL*.

continuação																					
rs75016989	EU							M							Amostra Total						
	C (n=158)		P (n=191)		OR	IC	P	C (n=71)		P (n=115)		OR	IC	P	C (n=211)		P (n=272)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CC	95,6	151	96,9	185				97,2	69	91,3	105				96,2	203	96,0	261			
CG	4,4	7	3,1	6	0,70	0,23 - 2,13	0,5789	2,8	2	8,7	10	3,29	0,70 - 15,45	0,1353	3,8	8	4,0	11	1,07	0,42 - 2,71	1
GG																					
C	97,8	309	98,4	376				98,6	140	95,7	220				98,1	414	98,0	533			
G	2,2	7	1,6	6	0,70	0,23 - 2,12	0,5824	1,4	2	4,3	10	3,18	0,69 - 14,74	0,1418	1,9	8	2,0	11	1,07	0,43 - 2,68	1
HW	0,7758									0,6259											
rs9907657	EU							M							Amostra Total						
	C (n=160)		P (n=189)		OR	IC	P	C (n=72)		P (n=116)		OR	IC	P	C (n=208)		P (n=288)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	81,9	131	81,5	154				68,1	49	79,3	92				76,0	158	80,6	232			
GT	17,5	28	18,5	35	1,06	0,61 - 1,84	0,8892	26,4	19	18,1	21	0,59	0,29 - 1,20	0,1949	21,6	45	18,4	53	0,80	0,51 - 1,25	0,3598
TT	0,6	1			NC	NC	NC	5,6	4	2,6	3	0,40	0,09 - 1,86	0,4221	2,4	5	1,0	3	0,41	0,10 - 1,73	0,2809
G	90,6	290	90,7	343				81,3	117	88,4	205				86,8	361	89,8	517			
T	9,4	30	9,3	35	0,99	0,59 - 1,65	1	18,8	27	11,6	27	0,57	0,32 - 1,02	0,0691	13,2	55	10,2	59	0,75	0,51 - 1,11	0,1583
GG+GT	99,4	159	100,0	189	NC	NC	NC	94,5	68	97,4	113	2,22	0,48 - 10,20	0,4310	97,6	203	99,0	285	2,34	0,55 - 9,90	0,2890
TT+GT	18,1	29	18,5	35	1,03	0,60 - 1,77	1	32,0	23	20,7	24	0,56	0,28 - 1,08	0,1183	24,0	50	19,4	56	0,76	0,50 - 1,17	0,2241
HW	0,7054		0,1607							0,2559		0,197					0,9889				
rs55725943	EU							M							Amostra Total						
	C (n=160)		P (n=192)		OR	IC	P	C (n=72)		P (n=115)		OR	IC	P	C (n=550)		P (n=337)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	87,5	140	89,6	172				88,9	64	90,4	104				86,2	474	89,6	302			
GC	11,9	19	9,9	19	0,81	0,41 - 1,60	0,6063	9,7	7	9,6	11	0,97	0,36 - 2,62	1	12,9	71	10,1	34	0,75	0,49 - 1,16	0,2013
CC	0,6	1	0,5	1	NC	NC	NC	1,4	1			NC	NC	NC	0,9	5	0,3	1	0,31	0,04 - 2,70	0,4137
G	93,4	299	94,5	363				93,8	135	95,2	219				92,6	1019	94,7	638			
C	6,6	21	5,5	21	0,82	0,44 - 1,54	0,6322	6,3	9	4,8	11	0,75	0,30 - 1,87	0,6379	7,4	81	5,3	36	0,71	0,47 - 1,06	0,0960
GG+GC	99,4	159	99,5	191	NC	NC	NC	98,6	71	100,0	115	NC	NC	NC	99,1	545	99,7	336	3,08	0,36 - 26,50	0,4168
CC+GC	12,5	20	10,4	20	0,81	0,42 - 1,57	0,6138	11,1	8	9,6	11	0,85	0,32 - 2,22	0,8053	13,8	76	10,4	35	0,72	0,47 - 1,11	0,1441
HW	0,6885		0,5523					0,1483		0,5901					0,2072		0,9668				

continua

continuação

continua

Tabela 9. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs dos genes *TWEAK* e *APRIL*.

															conclusão						
rs3803800	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=154)		(n=183)					(n=69)		(n=112)					(n=207)		(n=263)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	50,6	78	45,4	83				31,9	22	33,0	37				46,4	96	42,2	111			
GA	37,7	58	40,4	74	1,20	0,76 - 1,90	0,4807	44,9	31	50,9	57	1,09	0,55 - 2,17	0,8615	40,6	84	42,6	112	1,15	0,78 - 1,71	0,4848
AA	11,7	18	14,2	26	1,36	0,69 - 2,67	0,3988	23,2	16	16,1	18	0,67	0,28 - 1,57	0,3875	13,0	27	15,2	40	1,28	0,73 - 2,24	0,4003
G	69,5	214	65,6	240				54,3	75	58,5	131				66,7	276	63,5	334			
A	30,5	94	34,4	126	1,20	0,86 - 1,65	0,2852	45,7	63	41,5	93	0,85	0,55 - 1,30	0,4467	33,3	138	36,5	192	1,15	0,88 - 1,51	0,3354
HW	0,1648		0,158					0,432		0,6113					0,2109		0,1871				
rs6608	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)		(n=188)					(n=71)		(n=115)					(n=429)		(n=331)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CC	72,2	114	77,1	145				77,5	55	74,8	86				74,6	320	75,5	250			
CT	24,7	39	20,7	39	0,79	0,47 - 1,31	0,3665	19,7	14	25,2	29	1,32	0,64 - 2,73	0,4772	23,3	100	23,0	76	0,97	0,69 - 1,37	0,9308
TT	3,2	5	2,1	4	0,63	0,17 - 2,40	0,5163	2,8	2			***	***	***	2,1	9	1,5	5	0,71	0,24 - 2,15	0,5974
C	84,5	267	87,5	329				87,3	124	87,4	201				86,2	740	87,0	576			
T	15,5	49	12,5	47	0,78	0,51-1,20	0,2707	12,7	18	12,6	29	0,99	0,53 - 1,86	1	13,8	118	13,0	86	0,94	0,69 - 1,26	0,6629
HW	0,4659		0,4786					0,357		0,1218					0,7184		0,7756				

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos, genótipos, ou de alelos; % - porcentagem de indivíduos, genótipos, ou alelos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; *P* - valor de *P* na comparação das frequências; HW - valor de *P* para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg; NC - não calculado. *Valor de *P* com correção de Yates. Em negrito estão destacados os valores de *P* e OR significativos.

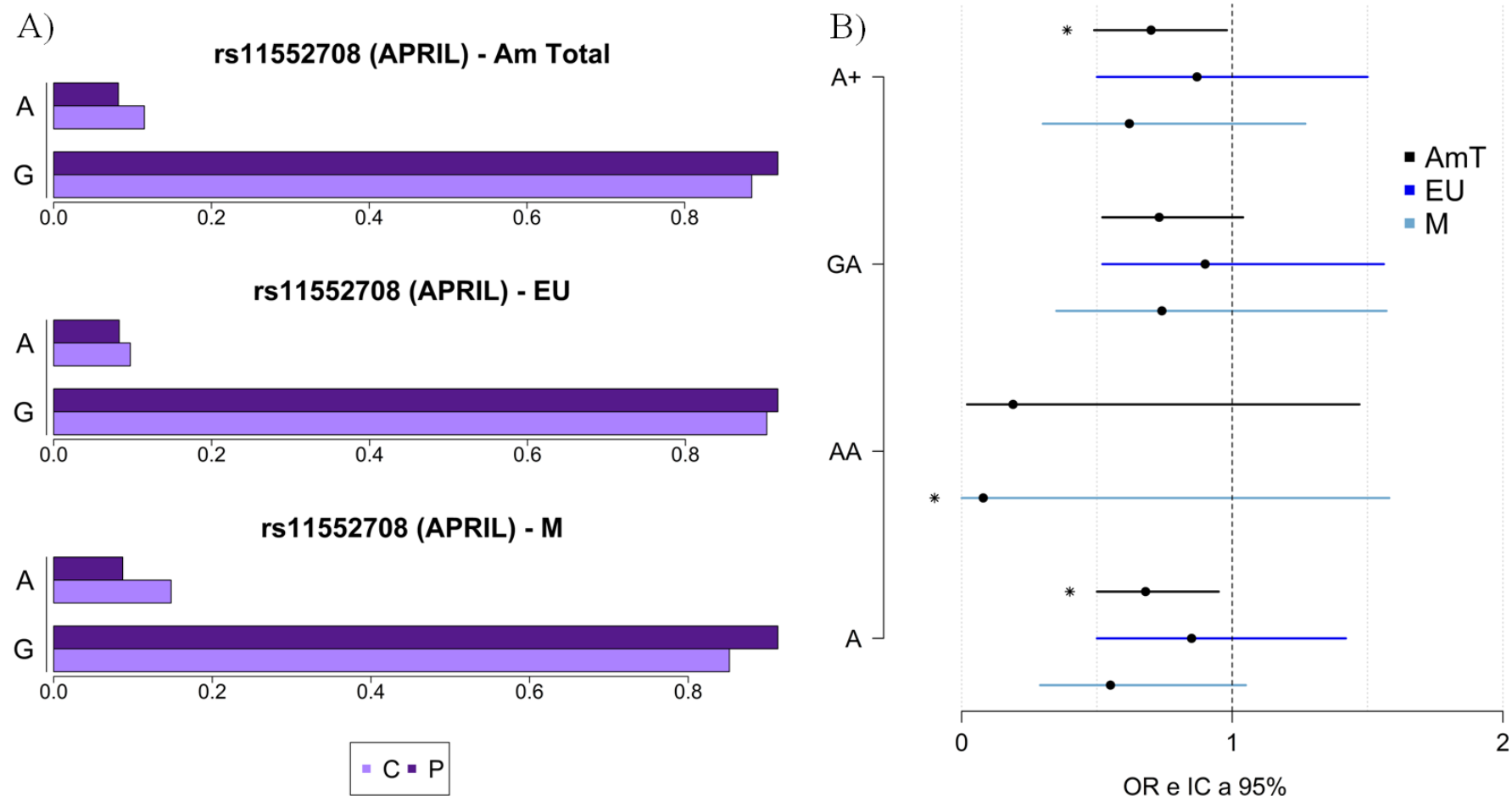


Figura 13. Frequências alélicas e valores de OR, IC e *P* para rs11552708 (APRIL). A) Frequências alélicas. Am Total: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C: controles; P: pacientes. B) Os pontos indicam os valores de *odds ratio* (OR), as barras indica os intervalos de confiança (IC); Am T: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; *: valor de *P* menor que 0,05.

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *TACI*.

Tabela 10 - Frequências e Genótipos, valores de OR, IC 95% para SNPs do gene GRIK1																					
rs34562254	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)		(n=189)					(n=71)		(n=116)					(n=429)		(n=334)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CC	79,1	125	77,8	147				81,7	58	78,4	91				79,0	339	78,4	262			
CT	20,3	32	22,2	42	1,12	0,66 - 1,87	0,6950	18,3	13	19,8	23	1,13	0,53 - 2,40	0,8495	19,8	85	21,0	70	1,07	0,75 - 1,52	0,7855
TT	0,6	1			NC	NC	NC			1,7	2	NC	NC	NC	1,2	5	0,6	2	0,52	0,10 - 2,69	0,4786
C	89,2	282	88,9	336				90,8	129	88,4	205				88,9	763	88,9	594			
T	10,8	34	11,1	42	1,04	0,64 - 1,67	0,9035	9,2	13	11,6	27	1,31	0,65 - 2,62	0,4947	11,1	95	11,1	74	1,00	0,72 - 1,38	1
HW	0,4921		0,0857					0,3958		0,6986					0,8988		0,2437				
rs17793572	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=160)		(n=183)					(n=72)		(n=113)					(n=423)		(n=323)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	60,0	96	57,9	106				72,2	52	62,8	71				63,1	267	59,4	192			
GA	33,1	53	33,9	62	1,06	0,67 - 1,68	0,8160	22,2	16	29,2	33	1,51	0,75 - 3,03	0,3006	31,9	135	32,5	105	1,08	0,79 - 1,48	0,6297
AA	6,9	11	8,2	15	1,24	0,54 - 2,82	0,6797	5,6	4	8,0	9	1,65	0,48 - 5,64	0,5579	5,0	21	8,0	26	1,72	0,94 - 3,15	0,0889
G	76,6	245	74,9	274				83,3	120	77,4	175				79,1	669	75,7	489			
A	23,4	75	25,1	92	1,10	0,77 - 1,56	0,6559	16,7	24	22,6	51	1,46	0,85 - 2,50	0,1863	20,9	177	24,3	157	1,21	0,95 - 1,55	0,1206
GG+GA	93,1	149	91,8	168	0,83	0,37 - 1,86	0,6872	94,4	68	92,0	104	0,68	0,20 - 2,30	0,5746	95,0	402	91,9	297	0,60	0,33 - 1,08	0,0952
AA+GA	40,0	64	42,1	77	1,09	0,71 - 1,68	0,7418	27,8	20	37,2	42	1,54	0,81 - 2,92	0,2045	36,9	156	40,5	131	1,17	0,87 - 1,57	0,3239
HW	0,33		0,177					0,0897		0,0806					0,4654		0,0363				
rs4792800	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=161)		(n=189)					(n=72)		(n=116)					(n=240)		(n=333)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	78,9	127	77,8	147				80,6	58	79,3	92				78,8	189	78,4	261			
GA	20,5	33	21,7	41	1,07	0,64 - 1,80	0,7945	19,4	14	20,7	24	1,08	0,53 - 2,26	0,8547	20,8	50	21,3	71	1,03	0,68 - 1,55	0,9177
GG	0,6	1	0,5	1	NC	NC	NC								0,4	1	0,3	1	NC	NC	NC
A	89,1	287	88,6	335				90,3	130	89,7	208				89,2	428	89,0	593			
G	10,9	35	11,4	43	1,05	0,66 - 1,69	0,9042	9,7	14	10,3	24	1,07	0,53 - 2,15	0,8629	10,8	52	11,0	73	1,01	0,70 - 1,48	1
HW	0,463		0,2969					0,3608		0,214					0,2248		0,1520*				

continua

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *TACI*.

rs12938073	EU								M						Amostra Total					
	C		P		OR	IC	P		C		P		OR	IC	P					
	(n=158)		(n=188)						(n=71)		(n=116)									
	%	n	%	n					%	n	%	n								
AA	24,7	39	30,3	57					21,1	15	29,3	34								
AT	47,5	75	50,0	94	0,86	0,52 - 1,43	0,6064		46,5	33	52,6	61	0,82	0,39 - 1,71	0,7095					
TT	27,8	44	19,7	37	0,58	0,32 - 1,05	0,0724		32,4	23	18,1	21	0,40	0,17 - 0,94	0,0378					
A	48,4	153	55,3	208					44,4	63	55,6	129								
T	51,6	163	44,7	168	0,76	0,56 - 1,02	0,0789		55,6	79	44,4	103	0,64	0,42 - 0,97	0,0427					
AA+AT	72,2	114	80,3	151	1,58	0,96 - 2,60	0,0763		67,6	48	81,9	95	2,17	1,09 - 4,30	0,0329					
TT+AT	75,3	119	69,7	131	0,75	0,47 - 1,21	0,2784		78,9	56	70,7	82	0,65	0,32 - 1,30	0,2351					
HW	0,5323		0,8753																	
rs12603708	EU								M						Amostra Total					
	C		P		OR	IC	P		C		P		OR	IC	P					
	(n=118)		(n=162)						(n=46)		(n=93)									
	%	n	%	n					%	n	%	n								
GG	61,9	73	53,1	86					56,5	26	50,5	47								
GA	24,6	29	37,0	60	1,76	1,02 - 3,02	0,0444		28,3	13	43,0	40	1,70	0,77 - 3,74	0,2418					
AA	13,6	16	9,9	16	0,85	0,40 - 1,81	0,7014		15,2	7	6,5	6	0,47	0,14 - 1,56	0,2316					
G	74,2	175	71,6	232					70,7	65	72,0	134								
A	25,8	61	28,4	92	1,14	0,78 - 1,66	0,5646		29,3	27	28,0	52	0,93	0,54 - 1,62	0,8877					
GG+GA	86,5	102	90,1	146	1,43	0,68 - 2,99	0,3484		84,8	39	93,5	87	2,60	0,82 - 8,25	0,1228					
AA+GA	38,2	45	46,9	76	1,43	0,88 - 2,32	0,1789		43,5	20	49,5	46	1,27	0,63 - 2,59	0,5891					
HW	0,0001		0,2562																	
rs4561508	EU								M						Amostra Total					
	C		P		OR	IC	P		C		P		OR	IC	P					
	(n=147)		(n=150)						(n=62)		(n=99)									
	%	n	%	n					%	n	%	n								
CC	78,2	115	78,7	118					85,5	53	80,8	80								
CT	21,1	31	21,3	32	1,01	0,58 - 1,76	1		14,5	9	18,2	18	1,33	0,55 - 3,17	0,6657					
TT	0,7	1			NC	NC	NC				1,0	1	NC	NC	NC					
C	88,8	261	89,3	268					92,7	115	89,9	178								
T	11,2	33	10,7	32	0,94	0,56 - 1,58	0,8956		7,3	9	10,1	20	1,44	0,63 - 3,26	0,4300					
HW	0,4807		0,1436																	
	EU								M						Amostra Total					
	C		P		OR	IC	P		C		P		OR	IC	P					
	(n=428)		(n=333)						(n=169)		(n=279)									
	%	n	%	n					%	n	%	n								
	24,5	105	29,1	97					59,2	100	53,0	148								
	49,1	210	51,7	172	0,89	0,63 - 1,25	0,5413		27,2	46	37,6	105	1,54	1,00 - 2,37	0,0539					
	26,4	113	19,2	64	0,61	0,41 - 0,93	0,0221		13,6	23	9,3	26	0,76	0,41 - 1,41	0,4291					
	49,1	420	55,0	366					72,8	246	71,9	401								
	50,9	436	45,0	300	0,79	0,64 - 0,97	0,0226		27,2	92	28,1	157	1,05	0,77 - 1,42	0,8175					
	73,6	315	80,8	269	1,51	1,07 - 2,13	0,0244		86,4	146	90,6	253	1,53	0,84 - 2,78	0,1633					
	75,5	323	70,9	236	0,79	0,57 - 1,09	0,1603		40,8	69	46,9	131	1,28	0,87 - 1,89	0,2394					
	0,7042		0,4297																	
	EU								M						Amostra Total					
	C		P		OR	IC	P		C		P		OR	IC	P					
	(n=290)		(n=259)						(n=290)		(n=259)									
	%	n	%	n					%	n	%	n								
	81,0	235	79,5	206					81,0	235	79,5	206								
	18,3	53	19,7	51	1,10	0,72 - 1,68	0,7434		18,3	53	19,7	51	1,10	0,72 - 1,68	0,7434					
	0,7	2	0,8	2	NC	NC	NC		0,7	2	0,8	2	NC	NC	NC					
	90,2	523	89,4	463					90,2	523	89,4	463								
	9,8	57	10,6	55	1,09	0,74 - 1,61	0,6629		9,8	57	10,6	55	1,09	0,74 - 1,61	0,6629					
	0,5956		0,547																	

continua

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *TAC1*.

continuação																
rs11651242	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=116)		(n=119)					(n=46)		(n=79)						
	%	n	%	n				%	n	%	n		%	n		
GG	25,9	30	21,0	25				23,9	11	20,3	16		24,1	55		
GT	45,7	53	48,7	58	1,31	0,69 - 2,51	0,5097	50,0	23	49,4	39	1,17	0,46 - 2,94	0,8142		
TT	28,4	33	30,3	36	1,31	0,64 - 2,66	0,4754	26,1	12	30,4	24	1,38	0,49 - 3,87	0,6033		
G	48,7	113	45,4	108				48,9	45	44,9	71		49,1	224		
T	51,3	119	54,6	130	1,14	0,80 - 1,64	0,5178	51,1	47	55,1	87	1,17	0,70 - 1,96	0,5995		
HW	0,3566		0,8545					0,9974		0,9828			0,9963			
													0,9214			
rs7216399	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=159)		(n=187)					(n=71)		(n=116)						
	%	n	%	n				%	n	%	n		%	n		
GG	50,9	81	51,9	97				54,9	39	54,3	63		52,2	224		
GA	40,9	65	38,0	71	0,91	0,58 - 1,43	0,7324	38,0	27	37,9	44	1,01	0,54 - 1,88	1		
AA	8,2	13	10,2	19	1,22	0,57 - 2,62	0,7008	7,0	5	7,8	9	1,11	0,35 - 3,57	1		
G	71,4	227	70,9	265				73,9	105	73,3	170		72,6	623		
A	28,6	91	29,1	109	1,03	0,74 - 1,43	0,9330	26,1	37	26,7	62	1,04	0,64 - 1,66	0,9045		
HW	0,9937		0,2698					0,9119		0,7344			0,5962			
rs8082017	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=159)		(n=182)					(n=71)		(n=113)						
	%	n	%	n				%	n	%	n		%	n		
AA	79,9	127	84,6	154				74,6	53	85,8	97		79,8	273		
CA	20,1	32	14,8	27	0,70	0,40 - 1,22	0,2509	22,5	16	13,3	15	0,51	0,23 - 1,12	0,1056		
CC			0,5	1	NC	NC	NC	2,8	2	0,9	1	NC	NC	NC		
A	89,9	286	92,0	335				85,9	122	92,5	209		89,3	611		
C	10,1	32	8,0	29	0,77	0,46 - 1,31	0,3497	14,1	20	7,5	17	0,50	0,25 - 0,98	0,0501		
AA+CA	100,0	159	99,4	181	NC	NC	NC	97,1	69	99,1	112	NC	NC	NC		
CC+CA	20,1	32	15,3	28	0,72	0,41 - 1,26	0,2582	25,3	18	14,2	16	0,49	0,23 - 1,03	0,0782		
HW	0,1583		0,8753					0,5618		0,6258			0,9527			
													0,5175			
continua																

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *TAC1*.

continuação																					
rs11078360	EU						M						Amostra Total								
	C (n=153)		P (n=181)		OR	IC	P	C (n=68)		P (n=112)		OR	IC	P	C (n=403)		P (n=318)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	79,1	121	84,5	153				75,0	51	85,7	96				80,4	324	84,6	269			
AG	20,9	32	14,4	26	0,64	0,36 - 1,14	0,1475	22,1	15	13,4	15	0,53	0,24 - 1,17	0,1468	18,6	75	14,2	45	0,72	0,48 - 1,08	0,1304
AA			1,1	2	NC	NC	NC	2,9	2	0,9	1	NC	NC	NC	1,0	4	1,3	4	1,20	0,30 - 4,86	1
G	89,5	274	91,7	332				86,0	117	92,4	207				89,7	723	91,7	583			
A	10,5	32	8,3	30	0,77	0,46 - 1,31	0,3514	14,0	19	7,6	17	0,51	0,25 - 1,01	0,0688	10,3	83	8,3	53	0,79	0,55 - 1,14	0,2045
GG+AG	100,0	153	98,9	179	NC	NC	NC	97,1	66	99,1	111	NC	NC	NC	99,0	399	98,8	314	0,79	0,20 - 3,17	1
AA+AG	20,9	32	15,5	28	0,69	0,40 - 1,21	0,2018	25,0	17	14,3	16	0,50	0,23 - 1,07	0,0776	19,6	79	15,5	49	0,75	0,51 - 1,10	0,1693
HW	0,1486		0,4592					0,49723		0,6325					0,8827		0,1884				
rs7226097	EU						M						Amostra Total								
	C (n=83)		P (n=96)		OR	IC	P	C (n=46)		P (n=59)		OR	IC	P	C (n=168)		P (n=159)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	53,0	44	61,5	59				50,0	23	54,2	32				51,2	86	57,9	92			
CT	42,2	35	35,4	34	0,72	0,39 - 1,34	0,3499	41,3	19	44,1	26	0,98	0,44 - 2,18	1	42,9	72	39,0	62	0,81	0,51 - 1,26	0,3618
CC	4,8	4	3,1	3	0,56	0,12 - 2,63	0,6968	8,7	4	1,7	1	0,18	0,02 - 1,71	0,1643	6,0	10	3,1	5	0,47	0,15 - 1,42	0,1907
T	74,1	123	79,2	152				70,7	65	76,3	90				72,6	244	77,4	246			
C	25,9	43	20,8	40	0,75	0,46 - 1,23	0,2617	29,3	27	23,7	28	0,75	0,40 - 1,39	0,4293	27,4	92	22,6	72	0,78	0,54 - 1,11	0,1762
HW	0,3695		0,4703					0,9784		0,1681*					0,3139		0,1537				
rs6416870	EU						M						Amostra Total								
	C (n=153)		P (n=180)		OR	IC	P	C (n=70)		P (n=109)		OR	IC	P	C (n=209)		P (n=261)		OR	IC	P
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TT	43,1	66	44,4	80				58,6	41	48,6	53				46,9	98	46,7	122			
TC	41,8	64	43,9	79	1,02	0,64 - 1,62	1	35,7	25	38,5	42	1,30	0,68 - 2,47	0,5158	40,7	85	40,2	105	0,99	0,67 - 1,47	1
CC	15,0	23	11,7	21	0,75	0,38 - 1,48	0,4912	5,7	4	12,8	14	2,71	0,83 - 8,84	0,1174	12,4	26	13,0	34	1,05	0,59 - 1,87	0,8846
T	64,1	196	66,4	239				76,4	107	67,9	148				67,2	281	66,9	349			
C	35,9	110	33,6	121	0,90	0,66 - 1,24	0,5676	23,6	33	32,1	70	1,53	0,95 - 2,49	0,0942	32,8	137	33,1	173	1,02	0,77 - 1,34	0,9444
TT+TC	84,9	130	88,3	159	1,34	0,71 - 2,53	0,4181	94,3	66	87,1	95	0,41	0,13 - 1,31	0,1360	87,6	183	86,9	227	0,95	0,55 - 1,64	0,8900
CC+TC	56,8	87	55,6	100	0,95	0,61 - 1,46	0,8254	41,4	29	51,3	56	1,49	0,81 - 2,74	0,2213	53,1	111	53,2	139	1,01	0,70 - 1,45	1
HW	0,2569		0,8241					0,9414		0,225					0,2652		0,1363				
continua																					

Tabela 10. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *TAC1*.

conclusão																
rs9893198	EU						M					Amostra Total				
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P		
	(n=157)		(n=190)					(n=71)		(n=115)						
	%	n	%	n				%	n	%	n					
GG	29,9	47	25,3	48				19,7	14	24,3	28					
AG	49,0	77	55,8	106	1,35	0,82 - 2,22	0,2543	53,5	38	49,6	57	0,75	0,35 - 1,61	0,5674		
AA	21,0	33	18,9	36	1,07	0,57 - 1,99	0,8751	26,8	19	26,1	30	0,79	0,33 - 1,87	0,6645		
G	54,5	171	53,2	202				46,5	66	49,1	117					
A	45,5	143	46,8	178	1,05	0,78 - 1,42	0,7599	53,5	76	50,9	113	0,84	0,55 - 1,28	0,4552		
HW	0,8879		0,0974					0,5232		0,9283						

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos, genótipos, ou de alelos; % - porcentagem de indivíduos, genótipos, ou alelos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; *P* - valor de *P* na comparação das frequências; HW - valor de *P* para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg; NC - não calculado. *Valor de *P* com correção de Yates. Em negrito estão destacados os valores de *P* e OR significativos.

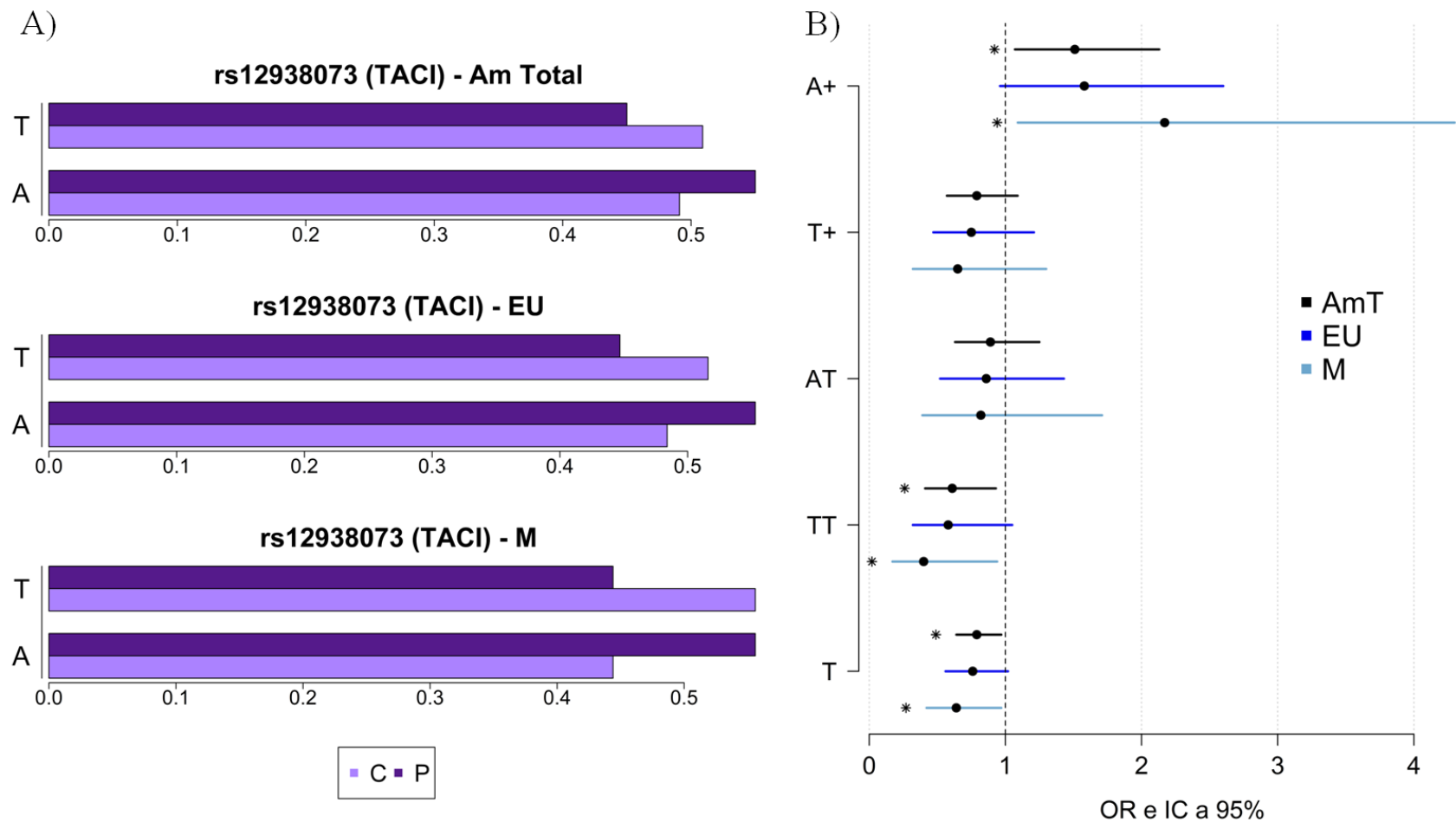


Figura 14. Frequências alélicas e valores de OR, IC e P para rs12938073 (TACI). A) Frequências alélicas. Am Total: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C: controles; P: pacientes. B) Os pontos indicam os valores de *odds ratio* (OR), as barras indica os intervalos de confiança (IC); Am T: amostra total; EU: indivíduos de origem predominantemente europeia; M: indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; *: valor de P menor que 0,05.

Tabela 11. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFFR*.

rs7290134	EU						M						Amostra Total								
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=160)		(n=188)					(n=72)		(n=116)					(n=214)		(n=269)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	35,6	57	34,0	64				19,4	14	19,8	23				29,9	64	29,0	78			
GA	42,5	68	46,8	88	1,15	0,72 - 1,86	0,6265	52,8	38	50,9	59	0,95	0,43 - 2,06	1	45,3	97	46,8	126	1,07	0,70 - 1,63	0,8289
GG	21,9	35	19,1	36	0,92	0,51 - 1,65	0,8811	27,8	20	29,3	34	1,03	0,44 - 2,46	1	24,8	53	24,2	65	1,01	0,62 - 1,64	1
A	56,9	182	57,4	216				45,8	66	45,3	105				52,6	225	52,4	282			
G	43,1	138	42,6	160	0,98	0,72 - 1,32	0,9387	54,2	78	54,7	127	1,02	0,67 - 1,55	0,9156	47,4	203	47,6	256	1,01	0,78 - 1,30	1
HW	0,091		0,5592																		
rs5996087	EU						M						Amostra Total								
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=160)		(n=186)					(n=72)		(n=113)					(n=207)		(n=282)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AA	81,9	131	77,4	144				72,2	52	67,3	76				77,8	161	73,0	206			
GA	16,3	26	21,5	40	1,40	0,81 - 2,42	0,2715	25,0	18	28,3	32	1,22	0,62 - 2,39	0,6118	19,8	41	24,5	69	1,32	0,85 - 2,04	0,2283
GG	1,9	3	1,1	2	0,61	0,10 - 3,69	0,6728	2,8	2	4,4	5	1,71	0,32 - 9,15	0,7019	2,4	5	2,5	7	1,09	0,34 - 3,51	1
A	90,0	288	88,2	328				84,7	122	81,4	184				87,7	363	85,3	481			
G	10,0	32	11,8	44	1,21	0,75 - 1,96	0,4665	15,3	22	18,6	42	1,27	0,72 - 2,23	0,4815	12,3	51	14,7	83	1,23	0,84 - 1,79	0,3014
HW	0,2188		0,672																		
rs55898132	EU						M						Amostra Total								
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=159)		(n=186)					(n=71)		(n=114)					(n=419)		(n=327)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GG	89,3	142	91,9	171				91,5	65	87,7	100				87,4	366	90,5	296			
GC	10,1	16	7,5	14	0,73	0,34 - 1,54	0,4465	8,5	6	11,4	13	1,41	0,51 - 3,89	0,6223	11,9	50	8,9	29	0,72	0,44 - 1,16	0,1885
CC	0,6	1	0,5	1	NC	NC	NC			0,9	1	NC	NC	NC	0,7	3	0,6	2	0,82	0,14 - 4,97	1
G	94,3	300	95,7	356				95,8	136	93,4	213				93,3	782	95,0	621			
C	5,7	18	4,3	16	0,75	0,38 - 1,49	0,4814	4,2	6	6,6	15	1,60	0,60 - 4,21	0,3689	6,7	56	5,0	33	0,74	0,48 - 1,16	0,1859
HW	0,4663		0,2426																		

continua

Tabela 11. Frequências alélicas e genotípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFFR*.

continuação																						
rs73165134	EU							M							Amostra Total							
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
	(n=146)		(n=158)					(n=66)		(n=103)					(n=295)		(n=272)					
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n				
CC	89,0	130	90,5	143				90,9	60	89,3	92				88,8	262	90,4	246				
CG	10,3	15	8,9	14	0,85	0,39 - 1,83	0,7001	9,1	6	10,7	11	1,20	0,42 - 3,41	0,7993	10,5	31	9,2	25	0,86	0,49 - 1,50	0,6729	
GG	0,7	1	0,6	1	NC	NC	NC								0,7	2	0,4	1	NC	NC	NC	
C	94,2	275	94,9	300				95,5	126	94,7	195				94,1	555	95,0	517				
G	5,8	17	5,1	16	0,86	0,43 - 1,74	0,7225	4,5	6	5,3	11	1,18	0,43 - 3,28	0,8046	5,9	35	5,0	27	0,83	0,49 - 1,39	0,4751	
HW	0,4458		0,3248									0,6989		0,567								
rs77874543	EU							M							Amostra Total							
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
	(n=157)		(n=188)					(n=69)		(n=116)					(n=424)		(n=333)					
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n				
GG	90,4	142	91,0	171				94,2	65	91,4	106				91,5	388	91,6	305				
GC	8,9	14	8,5	16	0,95	0,45 - 2,01	1	5,8	4	7,8	9	1,38	0,41 - 4,66	0,7695	8,3	35	7,8	26	0,95	0,56 - 1,60	0,8934	
CC	0,6	1	0,5	1	NC	NC	NC			0,9	1	NC	NC	NC	0,2	1	0,6	2	NC	NC	NC	
G	94,9	298	95,2	358				97,1	134	95,3	221				95,6	811	95,5	636				
C	5,1	16	4,8	18	0,94	0,47 - 1,87	0,8617	2,9	4	4,7	11	1,67	0,52 - 5,34	0,4307	4,4	37	4,5	30	1,03	0,63 - 1,69	0,8875	
HW	0,3283		0,3625									0,8042		0,1286								
rs5996088	EU							M							Amostra Total							
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
	(n=154)		(n=182)					(n=69)		(n=107)					(n=203)		(n=275)					
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n				
CC	82,5	127	80,2	146				76,8	53	70,1	75				79,8	162	76,4	210				
TC	15,6	24	18,1	33	1,20	0,67 - 2,13	0,5623	23,2	16	24,3	26	1,15	0,56 - 2,35	0,7219	18,7	38	20,4	56	1,14	0,72 - 1,80	0,6414	
TT	1,9	3	1,6	3	0,87	0,17 - 4,39	1			5,6	6	9,21	,51 - 167,04	0,0808	1,5	3	3,3	9	2,31	0,62 - 8,69	0,2468	
C	90,3	278	89,3	325				88,4	122	82,2	176				89,2	362	86,5	476				
T	9,7	30	10,7	39	1,11	0,67 - 1,84	0,7038	11,6	16	17,8	38	1,64	0,88 - 3,09	0,1313	10,8	44	13,5	74	1,28	0,86 - 1,90	0,2341	
CC+TC	98,1	151	98,3	179	1,19	0,24 - 5,96	1	100,0	69	94,4	101	0,11	0,01 - 2,03	0,0826	98,5	200	96,8	266	0,44	0,12 - 1,66	0,2517	
TT+TC	17,5	27	19,7	36	1,16	0,67 - 2,02	0,6744	23,2	16	29,9	32	1,41	0,70 - 2,83	0,3876	20,2	41	23,7	65	1,22	0,79 - 1,90	0,3761	
HW	0,1584		0,4804									0,276		0,1449*								

continua

Tabela 11. Frequências alélicas e genótípicas, valores de OR, IC e *P* para SNPs do gene *BAFFR*.

															conclusão							
rs12158335	EU								M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
	(n=160)		(n=188)					(n=71)		(n=115)					(n=211)		(n=271)					
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n				
TT	38,1	61	35,6	67				22,5	16	25,2	29				31,8	67	31,7	86				
GT	40,6	65	45,2	85	1,19	0,74 - 1,91	0,5457	57,7	41	47,0	54	0,73	0,35 - 1,51	0,4628	46,9	99	45,4	123	0,97	0,64 - 1,47	0,9159	
GG	21,3	34	19,1	36	0,96	0,54 - 1,73	1	19,7	14	27,8	32	1,26	0,53 - 3,03	0,6595	21,3	45	22,9	62	1,07	0,65 - 1,77	0,8003	
T	58,4	187	58,2	219				51,4	73	48,7	112				55,2	233	54,4	295				
G	41,6	133	41,8	157	1,01	0,74 - 1,36	1	48,6	69	51,3	118	1,11	0,73 - 1,69	0,6696	44,8	189	45,6	247	1,03	0,80 - 1,33	0,8449	
HW	0,0384		0,3339					0,1891		0,5183					0,4562		0,1614					

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos, genótipos, ou de alelos; % - porcentagem de indivíduos, genótipos, ou alelos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; *P* - valor de *P* na comparação das frequências; HW - valor de *P* para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg; NC - não calculado. *Valor de *P* com correção de Yates.

Tabela 12. Resultado da análise de regressão logística incluindo os genótipos dos SNPs associados, sexo, etnia, ocupação, escolaridade e local de residência.

	Significância (<i>P</i>)
rs11069727*AG (<i>BAFF</i>)	0,76751
rs11069727*GG (<i>BAFF</i>)	0,57522
rs4421862*GA (<i>BAFF</i>)	0,67216
rs4421862*AA (<i>BAFF</i>)	0,84843
rs13332630*CA (<i>BCMA</i>)	0,30052
rs13332630*CC (<i>BCMA</i>)	0,97997
rs57851931*GA (<i>TWEAK</i>)	0,17146
rs57851931*GG (<i>TWEAK</i>)	0,38734
rs11552708*GA (<i>APRIL</i>)	0,05714
rs11552708*AA (<i>APRIL</i>)	0,04191
rs12938073*AT (<i>TACI</i>)	0,61234
rs12938073*TT (<i>TACI</i>)	0,01474
Etnia M	0,04578
sexo	0,2914
Ocupação	0,68262
Escolaridade	0,00439
Residência	0,00658

Em negrito, valores significativos. Etnia M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia. Os genótipos não listados foram utilizados como referência.

Tabela 13. Comparações de frequências genotípicas e frequências de heterozigotos com homozigotos, com valores de OR, IC e *P*, para SNPs do gene *BAFF*.

rs9514827	EU			M			Amostra Total		
	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>
TT	53,2	59,3	0,2060	62,9	67,0	0,5005	56,9	61,5	0,1218
TC	38,0	29,1		37,1	31,3		37,9	30,2	
CC	8,9	11,5			1,8		5,2	8,4	
TC vs. TT+CC	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>
	0,67	0,43 - 1,06	0,1059	0,77	0,41 - 1,44	0,4243	0,71	0,48 - 1,04	0,0789
rs9514828	EU			M			Amostra Total		
	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>
CC	37,4	40,7	0,1518	53,6	55,2	0,6053	45,3	47,1	0,5712
TC	49,0	39,7		40,6	42,2		44,3	40,1	
TT	13,5	19,6		5,8	2,6		10,4	12,8	
TC vs. CC+TT	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>
	0,68	0,45 - 1,05	0,1013	1,07	0,58 - 1,96	0,8780	0,84	0,59 - 1,21	0,4022
rs7991543	EU			M			Amostra Total		
	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>
TT	37,7	42,9	0,2982	33,3	32,7	0,4130	34,6	39,3	0,1503
AT	49,0	40,6		53,6	46,7		49,3	42,0	
AA	13,2	16,6		13,0	20,6		16,1	18,7	
AT vs. TT+AA	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>
	0,71	0,46 - 1,10	0,1464	0,76	0,41 - 1,39	0,4405	0,74	0,55 - 1,00	0,0587
rs9520829	EU			M			Amostra Total		
	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>	C %	P %	<i>P</i>
GG	58,8	62,8	0,1340	70,4	71,1	1	63,5	65,3	0,2288
CG	35,0	26,7		28,2	27,2		32,2	27,3	
CC	6,3	10,5		1,4	1,8		4,3	7,4	
CG vs. GG+CC	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>	OR	IC	<i>P</i>
	0,68	0,43 - 1,07	0,1036	0,95	0,49 - 1,85	1	0,79	0,53 - 1,17	0,2682

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; *P* - valor de *P* na comparação das frequências.

Tabela 14. Frequências haplotípicas, valores de OR, IC e P para haplótipos de SNPs dos genes *BAFF*, *BCMA*, *TWEAK*, *APRIL* e *TACI*.

BAFF rs11069727 rs4421862	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=155)		(n=184)					(n=70)		(n=113)					(n=207)		(n=265)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AG	67,4	209	61,1	225	0,76	0,55 - 1,04	0,0924	61,4	86	73,0	165	1,70	1,08 - 2,66	0,0212	64,7	268	65,1	345	1,02	0,78 - 1,33	0,9452
GA	28,4	88	34,8	128	1,35	0,97 - 1,87	0,0824	30,7	43	21,7	49	0,62	0,39 - 1,01	0,0629	29,5	122	29,5	160	1,04	0,78 - 1,37	0,8300
AA	4,2	13	4,1	15	0,97	0,45 - 2,07	1	7,9	11	5,3	12	0,66	0,28 - 1,53	0,3777	5,8	24	5,8	25	0,80	0,45 - 1,43	0,4639
DL (D' / r ²)	1,000 / 0,832							1,000 / 0,733							1,000 / 0,789						
BAFF rs7993590 rs11069727 rs4421862	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=159)		(n=187)					(n=70)		(n=116)					(n=211)		(n=268)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AAG	67,0	213	60,7	227	0,76	0,56 - 1,04	0,0961	61,4	86	70,7	164	1,51	0,97 - 2,36	0,0692	64,0	270	64,0	343	1,00	0,77 - 1,31	1
TGA	27,0	86	34,2	128	1,40	1,01 - 1,95	0,0476	30,7	43	21,6	50	0,62	0,38 - 1,00	0,0634	29,1	123	29,9	160	1,03	0,78 - 1,37	0,8308
AAA	3,8	12	3,7	14	0,99	0,45 - 2,18	1	7,9	11	5,2	12	0,64	0,27 - 1,49	0,3744	5,5	23	4,5	24	0,81	0,45 - 1,46	0,5476
TAG	0,9	3	0,5	2	NC	NC	NC			2,6	6	8,06	0,45 - 144,26	0,0874	0,7	3	1,1	6	NC	NC	NC
AGA	0,9	3	0,5	2	NC	NC	NC					NC	NC	NC	0,5	2	0,4	2	NC	NC	NC
TAA	0,3	1	0,3	1	NC	NC	NC					NC	NC	NC	0,2	1	0,2	1	NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,965 / 0,920 (rs7993590+rs11069727) 0,962 / 0,784 (rs7993590+rs4421862)							1,000 / 0,931 (rs7993590+rs11069727) 0,904 / 0,652 (rs7993590+rs4421862)							0,979 / 0,926 (rs7993590+rs11069727) 0,949 / 0,740 (rs7993590+rs4421862)						

continua

Tabela 14. Frequências haplotípicas, valores de OR, IC e *P* para haplótipos de SNPs dos genes *BAFF*, *BCMA*, *TWEAK*, *APRIL* e *TACI*.

continuação

BAFF rs7993590 rs11069727 rs4421862 rs4145212	EU						
	C		P		OR	IC	P
	(n=156)		(n=187)				
	%	n	%	n			
AAGT	53,2	166	52,4	196	0,97	0,72 - 1,31	0,8780
TGAT	14,4	45	17,6	66	1,27	0,84 - 1,92	0,2979
TGAA	12,8	40	16,6	62	1,35	0,88 - 2,08	0,1960
AAGA	13,5	42	8,3	31	0,58	0,36 - 0,95	0,0342
AAAT	3,8	12	3,7	14	0,97	0,44 - 2,13	1
TAGT	1,0	3	0,5	2	NC	NC	NC
AGAT			0,5	2	NC	NC	NC
TAAT	0,3	1	0,3	1	NC	NC	NC
AGAA	1,0	3			NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,255 / 0,049 (rs7993590+rs4145212)						
	0,281 / 0,060 (rs11069727+rs4145212)						
	0,216 / 0,029 (rs4421862+rs4145212)						

BAFF rs9514827 rs9514828	EU						
	C		P		OR	IC	P
	(n=154)		(n=182)				
	%	n	%	n			
TC	60,4	186	57,7	210	0,89	0,66 - 1,22	0,5291
CT	26,0	80	23,4	85	0,87	0,61 - 1,23	0,4720
TT	12,0	37	16,2	59	1,42	0,91 - 2,21	0,1501
CC	1,6	5	2,7	10	1,71	0,58 - 5,06	0,4344
DL (D' / r ²)	0,85 / 0,41						

BAFF rs9514827 rs7991543	EU						
	C		P		OR	IC	P
	(n=150)		(n=171)				
	%	n	%	n			
TA	37,0	111	35,7	122	0,94	0,68 - 1,30	0,7426
TT	34,7	104	37,7	129	1,14	0,83 - 1,58	0,4593
CT	27,7	83	24,9	85	0,86	0,61 - 1,23	0,4717
CA	0,7	2	1,8	6	NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,83 / 0,16						

	M						
	C		P		OR	IC	P
	(n=70)		(n=115)				
	%	n	%	n			
	53,6	75	61,7	142	1,40	0,91 - 2,14	0,1288
	15,7	22	13,5	31	0,84	0,46 - 1,51	0,6465
	15,0	21	8,3	19	0,51	0,26 - 0,99	0,0567
	7,9	11	8,7	20	1,12	0,52 - 2,41	0,8484
	7,9	11	5,2	12	0,65	0,28 - 1,51	0,3753
			2,6	6	8,14	0,45 - 145,55	0,0870
					NC	NC	NC
					NC	NC	NC
					NC	NC	NC
	0,275 / 0,048 (rs7993590+rs4145212)						
	0,277 / 0,055 (rs11069727+rs4145212)						
	0,168 / 0,015 (rs4421862+rs4145212)						

	Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P
	(n=210)		(n=268)				
	%	n	%	n			
	52,1	219	55,8	299	1,16	0,90 - 1,50	0,2670
	15,5	65	15,9	85	1,03	0,72 - 1,46	0,9287
	13,8	58	14,0	75	1,02	0,70 - 1,47	1
	11,7	49	8,2	44	0,68	0,44 - 1,04	0,0790
	5,5	23	4,5	24	0,81	0,45 - 1,45	0,5472
	0,7	3	1,1	6	NC	NC	NC
	0,2	1	0,4	2	NC	NC	NC
	0,2	1	0,2	1	NC	NC	NC
	0,2	1			NC	NC	NC
	0,269 / 0,051 (rs7993590+rs4145212)						
	0,287 / 0,060 (rs11069727+rs4145212)						
	0,209 / 0,025 (rs4421862+rs4145212)						

	M						
	C		P		OR	IC	P
	(n=69)		(n=112)				
	%	n	%	n			
	70,3	97	75,0	168	1,27	0,79 - 2,04	0,3312
	15,2	21	15,2	34	1,00	0,55 - 1,80	1
	10,9	15	7,6	17	0,67	0,32 - 1,40	0,341
	3,6	5	2,2	5	0,61	0,17 - 2,14	0,5145
	0,77 / 0,41						

	Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P
	(n=207)		(n=262)				
	%	n	%	n			
	64,3	266	63,7	334	0,98	0,75 - 1,28	0,8912
	22,0	91	20,8	109	0,93	0,68 - 1,28	0,6884
	11,4	47	12,8	67	1,14	0,77 - 1,70	0,5466
	2,4	10	2,7	14	1,11	0,49 - 2,52	0,8385
	0,82 / 0,42						

	M						
	C		P		OR	IC	P
	(n=68)		(n=103)				
	%	n	%	n			
	39,0	53	43,7	90	1,22	0,78 - 1,89	0,4334
	42,6	58	39,3	81	0,87	0,56 - 1,35	0,5746
	17,6	24	16,0	33	0,89	0,50 - 1,59	0,7672
	0,7	1	1,0	2	NC	NC	NC
	0,72 / 0,08						

	Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P
	(n=204)		(n=244)				
	%	n	%	n			
	39,0	159	38,5	188	0,98	0,75 - 1,29	0,9451
	36,8	150	37,7	184	1,04	0,79 - 1,37	0,7818
	23,5	96	22,1	108	0,92	0,68 - 1,26	0,6319
	0,7	3	1,6	8	NC	NC	NC
	0,80 / 0,13						

continua

Tabela 14. Frequências haplotípicas, valores de OR, IC e *P* para haplótipos de SNPs dos genes *BAFF*, *BCMA*, *TWEAK*, *APRIL* e *TACI*.

continuação

BAFF rs9514827 rs9520829	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=157)		(n=180)					(n=70)		(n=109)					(n=209)		(n=2595)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TG	72,0	226	71,9	259	1,00	0,71 - 1,40	1	80,7	113	82,1	179	1,10	0,64 - 1,89	0,7807	75,4	315	75,3	390	1,00	0,74 - 1,34	1
CC	23,2	73	21,9	79	0,93	0,65 - 1,33	0,7122	13,6	19	14,2	31	1,06	0,57 - 1,95	0,8776	19,4	81	19,7	102	1,02	0,74 - 1,41	0,934
CG	4,5	14	3,9	14	0,87	0,41 - 1,85	0,847	5,0	7	3,2	7	0,63	0,22 - 1,84	0,4136	4,8	20	3,5	18	0,72	0,37 - 1,37	0,3227
TC	0,3	1	2,2	8	7,11	0,88 - 57,20	0,0417	0,7	1	0,5	1	NC	NC	NC	0,5	2	1,5	8	NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,92 / 0,73							0,95 / 0,71							0,93 / 0,73						
BAFF rs9514828 rs7991543	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=149)		(n=175)					(n=67)		(n=107)					(n=202)		(n=249)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CA	37,9	113	36,9	129	0,96	0,69 - 1,32	0,8071	39,6	53	43,9	94	1,20	0,77 - 1,86	0,437	39,6	160	39,6	197	1,00	0,76 - 1,31	1
TT	38,3	114	39,7	139	1,06	0,77 - 1,46	0,7467	25,4	34	23,8	51	0,92	0,56 - 1,52	0,7979	32,9	133	34,1	170	1,06	0,80 - 1,39	0,7233
CT	23,5	70	23,4	82	1,00	0,69 - 1,44	1	35,1	47	32,2	69	0,88	0,56 - 1,39	0,6405	27,2	110	26,3	131	0,95	0,71 - 1,28	0,7627
TA	0,3	1			NC	NC	NC								0,2	1			NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,99 / 0,38							1 / 0,24							0,99 / 0,33						
BAFF rs9514828 rs9520829	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=154)		(n=187)					(n=69)		(n=113)					(n=205)		(n=267)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
CG	62,0	191	60,2	225	0,93	0,68 - 1,26	0,6367	73,9	102	76,5	173	1,15	0,71 - 1,88	0,6157	66,6	273	65,9	352	0,97	0,74 - 1,27	0,8354
TC	24,0	74	23,3	87	0,96	0,67 - 1,37	0,8563	14,5	20	15,5	35	1,08	0,60 - 1,96	0,8805	20,2	83	21,0	112	1,05	0,76 - 1,44	0,8081
TG	14,0	43	16,3	61	1,20	0,79 - 1,83	0,4539	11,6	16	8,0	18	0,66	0,32 - 1,34	0,2685	13,2	54	12,9	69	0,98	0,67 - 1,43	0,9225
CC			0,3	1	NC	NC	NC										0,2	1	NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,99 / 0,48							1 / 0,55							0,99 / 0,51						
BAFF rs7991543 rs9520829	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=150)		(n=174)					(n=69)		(n=104)					(n=203)		(n=247)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TG	38,7	116	39,1	136	1,02	0,74 - 1,40	0,9357	45,7	63	40,4	84	0,81	0,52 - 1,25	0,3745	40,6	165	38,9	192	0,93	0,71 - 1,21	0,6318
AG	37,3	112	36,5	127	0,96	0,70 - 1,33	0,8703	39,1	54	44,7	93	1,26	0,81 - 1,95	0,3193	39,2	159	39,5	195	1,01	0,77 - 1,33	0,9454
TC	23,7	71	24,1	84	1,03	0,71 - 1,47	0,9265	14,5	20	14,9	31	1,03	0,56 - 1,90	1	19,7	80	21,5	106	1,11	0,80 - 1,54	0,5627
AC	0,3	1	0,3	1	NC	NC	NC	0,7	1			NC	NC	NC	0,5	2	0,2	1	NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,95 / 0,17							0,91 / 0,11							0,94 / 0,15						

continua

Tabela 14. Frequências haplotípicas, valores de OR, IC e *P* para haplótipos de SNPs dos genes *BAFF*, *BCMA*, *TWEAK*, *APRIL* e *TACI*.

														conclusão							
BAFF rs9514827 rs9514828 rs7991543 rs9520829	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=157)		(n=185)					(n=70)		(n=116)					(n=209)		(n=266)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
TCAG	36,6	115	34,9	129	0,93	0,68 - 1,27	0,6889	36,4	51	42,2	98	1,28	0,83 - 1,97	0,277	37,6	157	37,6	200	1,00	0,77 - 1,30	1
TCTG	23,2	73	23,2	86	1,00	0,70 - 1,43	1	34,3	48	31,9	74	0,90	0,58 - 1,40	0,6497	26,8	112	26,1	139	0,97	0,72 - 1,29	0,8244
CTTC	23,6	74	21,4	79	0,88	0,61 - 1,26	0,5197	13,0	19	15,1	35	1,13	0,62 - 2,07	0,7622	19,4	81	19,7	105	1,02	0,74 - 1,41	0,9344
TTTG	11,5	36	14,6	54	1,32	0,84 - 2,07	0,2568	10,0	14	7,3	17	0,71	0,34 - 1,49	0,4391	10,8	45	11,7	62	1,09	0,73 - 1,64	0,6808
CTTG	2,9	9	1,4	5	0,46	0,15 - 1,40	0,1842	1,4	2	0,9	2	NC	NC	NC	2,4	10	0,9	5	0,39	0,13 - 1,14	0,1131
CCAG	1,3	4	2,2	8	1,71	0,51 - 5,74	0,403	3,6	5	2,2	5	0,59	0,17 - 2,09	0,5119	2,2	9	2,3	12	1,05	0,44 - 2,51	1
TTTC	0,3	1	1,9	7	NC	NC	NC	0,7	1	0,4	1	NC	NC	NC	0,5	2	1,3	7	NC	NC	NC
CCTG	0,3	1	0,3	1	NC	NC	NC								0,2	1	0,2	1	NC	NC	NC
CTAC	0,3	1			NC	NC	NC								0,2	1			NC	NC	NC
TCAC			0,3	1	NC	NC	NC										0,2	1	NC	NC	NC
TWEAK APRIL rs57851931 rs11552708	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=158)		(n=188)					(n=71)		(n=114)					(n=210)		(n=270)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
AG	77,8	246	77,4	291	0,97	0,68 - 1,39	0,9272	64,8	92	71,1	162	1,33	0,85 - 2,09	0,2492	73,8	310	75,6	408	1,10	0,82 - 1,47	0,5495
GG	12,3	39	14,1	53	1,17	0,75 - 1,82	0,5031	20,4	29	20,2	46	0,98	0,59 - 1,66	1	14,5	61	16,3	88	1,15	0,80 - 1,63	0,4733
AA	9,8	31	8,5	32	0,86	0,51 - 1,44	0,5967	14,8	21	8,3	19	0,52	0,27 - 1,01	0,0591	11,7	49	8,0	43	0,66	0,43 - 1,01	0,0602
GA										0,4	1	NC	NC	NC			0,2	1	NC	NC	NC
DL (D' / r ²)	0,454 / 0,003							0,751 / 0,018							0,706 / 0,010						
APRIL + TAC1 rs11552708 rs12938073	EU							M							Amostra Total						
	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
	(n=157)		(n=187)					(n=71)		(n=114)					(n=209)		(n=269)				
	%	n	%	n				%	n	%	n				%	n	%	n			
GA	46,8	147	53,5	200	1,31	0,97 - 1,76	0,0922	35,2	50	47,4	108	1,66	1,08 - 2,55	0,0235	45,2	189	53,0	285	1,36	1,06 - 1,76	0,0189
GT	43,3	136	38,0	142	0,80	0,59 - 1,09	0,1610	50,0	71	43,9	100	0,78	0,51 - 1,19	0,2838	43,1	180	38,8	209	0,84	0,65 - 1,09	0,2074
AT	8,6	27	6,7	25	0,76	0,43 - 1,34	0,3860	5,6	8	0,9	2	0,15	0,03 - 0,71	0,0084	9,3	39	6,3	34	0,66	0,41 - 1,06	0,0867
AA	1,3	4	1,9	7	NC	NC	NC	9,2	13	7,9	18	0,85	0,40 - 1,79	0,7020	2,4	10	1,9	10	0,77	0,32 - 1,87	0,6509
DL (D' / r ²)	0,347 / 0,013							0,006 / 0,000							0,213 / 0,005						

Tabela 15. Análise de interação entre rs4421862 (*BAFF*) e rs1332630 (*BCMA*).

rs4421862 (BAFF)	rs13332630 (BCMA)	EU							M						Am Total							
		C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
		n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%			
GG	AA	56	36,4	59	32,6				19	27,1	57	49,6				68	32,9	103	39,0			
	CA	12	7,8	7	3,9	0,55	0,20 - 1,51	0,3233	5	7,1	5	4,3	0,33	0,09 - 1,28	0,1334	16	7,7	9	3,4	0,37	0,16 - 0,89	0,0298
	CC			1	0,6	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,4	NC	NC	NC
GA	AA	59	38,3	75	41,4				31	44,3	39	33,9				80	38,6	101	38,3			
	CA	12	7,8	11	6,1	0,72	0,30 - 1,75	0,5030	7	10,0	5	4,3	0,57	0,16 - 1,96	0,5326	18	8,7	16	6,1	0,70	0,34 - 1,47	0,3559
	CC					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
AA	AA	13	8,4	22	12,2				7	10,0	9	7,8				22	10,6	28	10,6			
	CA	2	1,3	6	3,3	1,77	0,31 - 10,11	0,6916	1	1,4			NC	NC	NC	3	1,4	6	2,3	1,57	0,35 - 7,00	0,7199
	CC					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
G+	AA	115	51,1	134	50,2				50	46,3	96	60,4				148	48,5	204	53,5			
	CA	24	10,7	18	6,7	0,64	0,33 - 1,25	0,2423	12	11,1	10	6,3	0,43	0,18 - 1,07	0,0955	34	11,1	25	6,6	0,53	0,31 - 0,93	0,0331
	CC			1	0,4	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,3	NC	NC	NC
A+	AA	72	32,0	97	36,3				38	35,2	48	30,2				102	33,4	129	33,9			
	CA	14	6,2	17	6,4	0,90	0,42 - 1,95	0,8448	8	7,4	5	3,1	0,49	0,15 - 1,64	0,3716	21	6,9	22	5,8	0,83	0,43 - 1,56	0,6182
	CC					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
G+	A+	139	90,3	152	84,0	NC	NC	NC	62	88,6	106	92,2	NC	NC	NC	182	87,9	229	86,7	NC	NC	NC
	C+	24	15,6	19	10,5	0,68	0,35 - 1,30	0,2524	12	17,1	10	8,7	0,43	0,18 - 1,07	0,0955	34	16,4	26	9,8	0,55	0,32 - 0,96	0,0483
	A+	86	55,8	114	63,0	NC	NC	NC	46	65,7	53	46,1	NC	NC	NC	123	59,4	151	51,2	NC	NC	NC
A+	C+	14	9,1	17	9,4	0,90	0,42 - 1,95	0,8448	8	11,4	5	4,3	0,49	0,15 - 1,64	0,3716	21	10,1	22	8,3	0,83	0,43 - 1,59	0,6182
GG	AA	56	36,4	59	32,6				19	27,1	57	49,6				68	32,9	103	39,0			
		59	38,3	75	41,4	1,21	0,73 - 1,99	0,5241	31	44,3	39	33,9	0,42	0,21 - 0,85	0,0155	80	38,6	101	38,3	0,83	0,55 - 1,27	0,4497
		13	8,4	22	12,2	1,61	0,74 - 3,49	0,2510	7	10,0	9	7,8	0,43	0,14 - 1,31	0,2198	22	10,6	28	10,6	0,84	0,44 - 1,59	0,6256
GG	CA	12	7,8	7	3,9				5	7,1	5	4,3				16	7,7	9	3,4			
		12	7,8	11	6,1	1,57	0,45 - 5,43	0,5421	7	10,0	5	4,3	0,71	0,13 - 3,87	1	18	8,7	16	6,1	1,58	0,55 - 4,55	0,4354
		2	1,3	6	3,3	5,14	0,81 - 32,77	0,1032	1	1,4			NC	NC	NC	3	1,4	6	2,3	3,56	0,71 - 17,76	0,1392
GG	CC			1	0,6													1	0,4			
						NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
						NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
GG	A+	68	37,8	66	32,2				24	28,9	62	49,6				84	34,4	112	38,0			
		71	39,4	86	42,0	1,25	0,79 - 1,98	0,4099	38	45,8	44	35,2	0,45	0,24 - 0,85	0,0165	98	40,2	117	39,7	0,90	0,61 - 1,32	0,6195
		15	8,3	28	13,7	1,92	0,94 - 3,92	0,0805	8	9,6	9	7,2	0,44	0,15 - 1,26	0,1528	25	10,2	34	11,5	1,02	0,57 - 1,84	1
GG	C+	12	6,7	8	3,9				5	6,0	5	4,0				16	6,6	10	3,4			
		12	6,7	11	5,4	1,38	0,41 - 4,62	0,7599	7	8,4	5	4,0	0,71	0,13 - 3,87	1	18	7,4	16	5,4	1,42	0,50 - 4,02	0,6025
		2	1,1	6	2,9	4,50	0,72 - 28,15	0,2087	1	1,2			NC	NC	NC	3	1,2	6	2,0	3,20	0,65 - 15,78	0,2453
G+	A+	139	90,3	152	84,0	0,59	0,30 - 1,14	0,1403	62	88,6	106	92,2	1,52	0,56 - 4,14	0,4393	182	87,9	229	86,7	0,93	0,53 - 1,61	0,8886
		86	55,8	114	63,0	1,37	0,88 - 2,12	0,1798	46	65,7	53	46,1	0,45	0,24 - 0,82	0,0102	123	59,4	151	57,2	0,92	0,64 - 1,33	0,7065
		24	15,6	19	10,5	0,26	0,05 - 1,46	0,1400	12	17,1	10	8,7	NC	NC	NC	34	16,4	26	9,8	0,38	0,09 - 1,67	0,2853
A+	C+	14	9,1	17	9,4	1,82	0,58 - 5,70	0,3929	8	11,4	5	4,3	0,63	0,12 - 3,32	0,6850	21	10,1	22	8,3	1,68	0,62 - 4,52	0,3311

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; P - valor de P na comparação das frequências; NC - não calculado. Em negrito estão destacados os valores de P e OR significativos.

Tabela 16. Análise de interação entre rs4421862 (*BAFF*) e rs11552708 (*APRIL*).

rs4421862 (BAFF)		rs11552708 (APRIL)		EU					M					Am Total											
				C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
				n	%	N	%				n	%	n	%				n	%	n	%				n
GG	GG	59	38,1	51	27,6				14	20,0	55	48,7				65	31,4	95	35,6						
	GA	9	5,8	18	9,7	2,31	0,96 - 5,60	0,0848	8	11,4	6	5,3	0,19	0,06 - 0,64	0,0080	16	7,7	19	7,1	0,81	0,34 - 1,70	0,7053			
	AA	1	0,6			NC	NC	NC	2	2,9			0,05	0,00 - 1,15	0,0483	4	1,9			0,08	0,00 - 1,44	0,0298			
	GG	54	34,8	76	41,1				32	45,7	32	28,3				79	38,2	98	36,7						
	GA	17	11,0	12	6,5	0,50	0,22 - 1,36	0,1031	5	7,1	11	9,7	2,20	0,67 - 7,05	0,2629	18	8,7	21	7,9	0,94	0,47 - 1,89	1			
AA	AA					NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	1	0,5			NC	NC	NC			
	GG	12	7,7	26	14,1				7	10,0	7	6,2				20	9,7	30	11,2						
	GA	3	1,9	2	1,1	0,31	0,05 - 2,09	0,3236	1	1,4	2	1,8	2,00	0,15 - 27,45	1	4	1,9	4	1,5	0,67	0,15 - 2,98	0,7062			
	AA					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC			
G+	GG	113	50,0	127	46,5				46	42,6	87	55,8				144	47,2	193	50,0						
	GA	26	11,5	30	11,0	1,03	0,57 - 1,84	1	13	12,0	17	10,9	0,69	0,31 - 1,55	0,4039	34	11,1	40	10,4	0,88	0,53 - 1,46	0,6977			
	AA	1	0,4			NC	NC	NC	3	2,8			0,08	0,00 - 1,50	0,0449	5	1,6			0,07	0,00 - 1,24	0,0151			
	GG	66	29,2	102	37,4				39	36,1	39	25,0				99	32,5	128	33,2						
A+	GA	20	8,8	14	5,1	0,45	0,21 - 0,96	0,0387	6	5,6	13	8,3	2,17	0,75 - 6,28	0,2012	22	7,2	25	6,5	0,88	0,47 - 1,65	0,7478			
	AA					NC	NC	NC	1	0,9			NC	NC	NC	1	0,3			NC	NC	NC			
G+	G+	139	89,7	157	84,9	NC	NC	NC	59	84,3	104	92,0	12,34	0,62 - 242,11	0,0505	178	86,0	233	87,3	14,39	0,79 - 261,95	0,0160			
	A+	27	17,4	30	16,2	0,99	0,55 - 1,77	1	16	22,9	17	15,0	0,56	0,26 - 1,21	0,1615	39	18,8	40	15,0	0,77	0,47 - 1,25	0,3146			
A+	G+	86	55,5	116	62,7	NC	NC	NC	45	64,3	52	46,0	NC	NC	NC	121	58,4	153	57,3	NC	NC	NC			
	A+	20	12,9	14	7,6	0,45	0,21 - 0,96	0,0387	7	10,0	13	11,5	1,86	0,67 - 5,15	0,3162	23	11,1	25	9,4	0,84	0,45 - 1,47	0,6330			
GG	GG	59	38,1	51	27,6				14	20,0	55	48,7				65	31,4	95	35,6						
	GA	54	34,8	76	41,1	1,63	0,98 - 2,72	0,0698	32	45,7	32	28,3	0,25	0,12 - 0,55	0,0005	79	38,2	98	36,7	0,85	0,55 - 1,31	0,5085			
	AA	12	7,7	26	14,1	2,51	1,15 - 5,47	0,0238	7	10,0	7	6,2	0,25	0,08 - 0,85	0,0381	20	9,7	30	11,2	1,03	0,54 - 1,96	1			
	GG	9	5,8	18	9,7				8	11,4	6	5,3				16	7,7	19	7,1						
	GA	17	11,0	12	6,5	0,35	0,12 - 1,05	0,0677	5	7,1	11	9,7	2,93	0,66 - 13,09	0,2685	18	8,7	21	7,9	0,98	0,39 - 2,45	1			
	AA	3	1,9	2	1,1	0,33	0,05 - 2,37	0,3377	1	1,4	2	1,8	NC	NC	NC	4	1,9	4	1,5	0,84	0,18 - 3,92	1			
	GG	1	0,6						2	2,9						4	1,9								
	GA					NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	1	0,4			NC	NC	NC			
	AA					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC			
GG	GG	68	37,0	69	31,8				22	26,2	61	46,2				81	33,1	114	36,7						
	GA	71	38,6	88	40,1	1,22	0,77 - 1,93	0,4151	37	44,0	43	32,6	0,42	0,22 - 0,81	0,0096	97	39,6	119	38,3	0,87	0,59 - 1,29	0,5499			
	AA	15	8,1	28	12,9	1,84	0,90 - 3,75	0,1146	8	9,5	9	6,8	0,41	0,14 - 1,18	0,1438	24	9,8	34	10,9	1,01	0,56 - 1,83	1			
	GG	10	5,4	18	8,3				10	11,9	6	4,5				20	8,2	19	6,1						
	GA	17	9,2	12	5,5	0,39	0,13 - 1,14	0,1135	6	7,1	11	8,3	3,06	0,74 - 12,63	0,1694	19	7,8	21	6,8	1,16	0,48 - 2,81	0,8233			
	AA	3	1,6	2	0,9	0,37	0,05 - 2,60	0,3600	1	1,2	2	1,5	3,33	0,25 - 45,11	0,5459	4	1,6	4	1,3	1,05	0,23 - 4,82	1			
G+	G+	139	89,7	157	84,9	0,61	0,31 - 1,18	0,1444	59	84,3	104	92,0	1,57	0,57 - 4,28	0,4331	178	86,0	233	87,3	0,92	0,53 - 1,61	0,8875			
	A+	86	55,5	116	62,7	1,33	0,86 - 2,06	0,2220	45	64,3	52	46,0	0,42	0,22 - 0,78	0,0083	121	58,5	153	57,3	0,90	0,62 - 1,30	0,6363			
	G+	27	17,4	30	16,2	1,67	0,26 - 10,74	0,6666	16	22,9	17	15,0	NC	NC	NC	39	18,8	40	15,0	1,03	0,24 - 4,39	1			
	A+	20	12,9	14	7,6	0,39	0,14 - 1,09	0,0808	7	10,0	13	11,5	3,10	0,79 - 12,14	0,1787	23	11,1	25	9,4	1,14	0,49 - 2,67	0,8306			

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; P - valor de P na comparação das frequências; NC - não calculado. Em negrito estão destacados os valores de P e OR significativos.

Tabela 17. Análise de interação entre rs4421862 (*BAFF*) e rs12938073 (*TAC1*).

rs4421862 (BAFF)	rs12938073 (TAC1)	EU						M						Am Total									
		C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	
		n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%				n
GG	AA	21	13,5	23	12,4				3	4,3	17	14,8				22	10,5	32	12,0				
	AT	34	21,8	30	16,2	0,81	0,37 - 1,74	0,6957	12	17,1	33	28,7	0,49	0,12 - 1,96	0,3587	42	20,1	56	21,1	0,92	0,47 - 1,80	0,8645	
	TT	15	9,6	15	8,1	0,91	0,36 - 2,31	1	9	12,9	12	10,4	0,24	0,05 - 1,06	0,0855	22	10,5	25	9,4	0,78	0,35 - 1,72	0,5536	
GA	AA	12	7,7	24	13,0				9	12,9	13	11,3				20	9,6	33	12,4				
	AT	33	21,2	47	25,4	0,71	0,31 - 1,62	0,5372	17	24,3	23	20,0	0,94	0,33 - 2,69	1	45	21,5	62	23,3	0,84	0,43 - 1,64	0,6133	
	TT	26	16,7	18	9,7	0,35	0,14 - 0,87	0,0261	12	17,1	8	7,0	0,46	0,13 - 1,59	0,3543	33	15,8	24	9,0	0,44	0,21 - 0,95	0,03813	
AA	AA	4	2,6	9	4,9				3	4,3	4	3,5				8	3,8	13	4,9				
	AT	8	5,1	15	8,1	0,83	0,19 - 3,58	1	3	4,3	4	3,5	1,00	0,12 - 8,31	1	11	5,3	17	6,4	0,95	0,95 - 3,04	1	
	TT	3	1,9	4	2,2	0,59	0,09 - 3,98	0,6514	2	2,9	1	0,9	0,38	0,02 - 6,35	1	6	2,9	4	1,5	0,41	0,09 - 1,92	0,4414	
G+	AA	33	14,5	47	17,1				12	11,1	30	18,9				42	13,7	65	16,9				
	AT	67	29,5	77	28,1	0,81	0,46 - 1,40	0,4848	29	26,3	56	35,2	0,77	0,35 - 1,73	0,5533	87	28,3	118	30,6	0,88	0,54 - 1,41	0,6290	
	TT	41	18,1	33	12,0	0,57	0,30 - 1,07	0,1063	21	19,4	20	12,6	0,38	0,15 - 0,94	0,0447	55	17,9	49	12,7	0,58	0,33 - 0,99	0,0537	
A+	AA	16	7,0	33	12,0				12	11,1	17	10,7				28	9,1	46	11,9				
	AT	41	18,1	62	22,6	0,73	0,36 - 1,50	0,4744	20	18,5	27	17,0	0,95	0,37 - 2,44	1	56	18,2	79	20,5	0,86	0,48 - 1,54	0,6594	
	TT	29	12,8	22	8,0	0,37	0,16 - 0,83	0,0171	14	13,0	9	5,7	0,45	0,15 - 1,39	0,2640	39	12,7	28	7,3	0,44	0,22 - 0,86	0,0185	
G+	A+	100	64,1	124	67,0	1,54	0,91 - 2,61	0,1394	41	58,6	86	74,8	2,20	1,08 - 4,51	0,0400	129	61,7	183	68,8	1,59	1,02 - 2,49	0,0523	
	T+	108	69,2	110	59,5	0,72	0,43 - 1,20	0,2390	50	71,4	76	66,1	0,61	0,28 - 1,30	0,2678	142	67,9	167	62,8	0,76	0,49 - 1,19	0,2592	
	A+	57	36,5	95	51,3	2,20	1,15 - 4,18	0,0214	32	45,7	44	38,3	2,14	0,82 - 5,55	0,1529	84	40,2	125	47,0	2,07	1,19 - 3,62	0,0112	
A+	T+	70	44,9	84	45,4	0,58	0,30 - 1,14	0,1361	34	48,6	36	31,3	0,75	0,31 - 1,79	0,6584	95	45,5	107	40,2	0,69	0,40 - 1,18	0,2185	
	GG	21	13,5	23	12,4				3	4,3	17	14,8				22	10,5	32	12,0				
		GA	AA	12	7,7	24	13,0	1,83	0,73 - 4,54	0,2548	9	12,9	13	11,3	0,25	0,06 - 1,13	0,0913	20	9,6	33	12,4	1,13	0,52 - 2,47
AA			4	2,6	9	4,9	2,05	0,55 - 7,68	0,3503	3	4,3	4	3,5	0,24	0,03 - 1,63	0,2896	8	3,8	13	4,9	1,12	0,40 - 3,14	1
GG	34		21,8	30	16,2				12	17,1	33	28,7				42	20,1	56	21,1				
GA	AT	33	21,2	47	25,4	1,61	0,83 - 3,13	0,1803	17	24,3	23	20,0	0,49	0,20 - 1,22	0,1695	45	21,5	62	23,3	1,03	0,59 - 1,80	1	
	AA	8	5,1	15	8,1	2,13	0,79 - 5,71	0,1511	3	4,3	4	3,5	0,48	0,09 - 2,49	0,6579	11	5,3	17	6,4	1,16	0,49 - 2,73	0,8296	
	GG	15	9,6	15	8,1				9	12,9	12	10,4				22	10,5	25	9,4				
GA	TT	26	16,7	18	9,7	0,69	0,27 - 1,76	0,4820	12	17,1	8	7,0	0,50	0,14 - 1,73	0,3543	33	15,8	24	9,0	0,64	0,29 - 1,39	0,3245	
	AA	3	1,9	4	2,2	1,33	0,25 - 7,01	1	2	2,9	1	0,9	0,38	0,03 - 4,81	0,5761	6	2,9	4	1,5	0,59	0,15 - 2,35	0,5045	
	GG	55	23,8	53	19,1				15	14,7	50	28,6				64	20,8	88	22,0				
GA		A+	45	19,5	71	25,6	1,64	0,96 - 2,78	0,0807	26	25,5	36	20,6	0,42	0,19 - 0,89	0,0361	65	21,2	95	23,7	1,06	0,68 - 1,67	0,8187
		AA	12	5,2	24	8,7	2,08	0,94 - 4,57	0,0831	6	5,9	8	4,6	0,40	0,12 - 1,34	0,1809	19	6,2	30	7,5	1,15	0,59 - 2,22	0,7402
	GG	49	21,2	45	16,2				21	20,6	45	25,7				64	20,8	81	20,2				
GA	T+	59	25,5	65	23,5	1,20	0,70 - 2,05	0,5845	29	28,4	31	17,7	0,50	0,24 - 1,03	0,0696	78	25,4	86	21,4	0,87	0,56 - 1,36	0,5689	
	AA	11	4,8	19	6,9	1,88	0,81 - 4,38	0,1495	5	4,9	5	2,9	0,47	0,12 - 1,79	0,2962	17	5,5	21	5,2	0,98	0,48 - 2,00	1	
	G+	100	64,1	124	67,0	0,62	0,30 - 1,30	0,2118	41	58,6	86	74,8	1,57	0,51 - 4,83	0,5511	129	61,7	183	68,8	0,90	0,48 - 1,67	0,7575	
A+		57	36,5	95	51,4	1,73	1,05 - 2,85	0,0418	32	45,7	44	38,3	0,41	0,20 - 0,86	0,0202	84	40,2	125	47,0	1,08	0,71 - 1,65	0,7457	
		G+	108	69,2	110	59,5	0,59	0,27 - 1,30	0,2424	50	71,4	76	66,1	1,52	0,42 - 5,52	0,7396	142	67,9	167	62,8	0,95	0,48 - 1,87	1
	A+	70	44,9	84	45,4	1,31	0,78 - 2,19	0,3594	34	48,6	36	31,3	0,49	0,25 - 0,99	0,0555	95	45,5	107	40,2	0,89	0,58 - 1,37	0,6623	

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; P - valor de P na comparação das frequências. Em negrito estão destacados os valores de P e OR significativos.

Tabela 18. Análise de interação entre rs13332630 (BCMA) e rs11552708 (APRIL).

		EU							M							Am Total						
rs13332630 (BCMA)	rs11552708 (APRIL)	C (n = 158)		P (n = 187)		OR	IC	P	C (n = 71)		P (n = 114)		OR	IC	P	C (n = 414)		P (n = 327)		OR	IC	P
		n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%			
AA	GG	105	66,5	133	71,1				43	60,6	86	75,4				255	61,6	242	74,0			
	GA	26	16,5	26	13,9	0,79	0,43 - 1,44	0,4467	12	16,9	19	16,7	0,79	0,35 - 1,78	0,6741	73	17,6	45	13,8	0,65	0,43 - 0,98	0,0406
	AA					NC	NC	NC	3	4,2			0,07	0,00 - 1,42	0,0405	5	1,2	1	0,3	0,21	0,02 - 1,82	0,2176
	GG	23	14,6	24	12,8				10	14,1	8	7,0				62	15,0	34	10,4			
CA	GA	2	1,3	3	1,6	1,44	0,22 - 9,41	1	3	4,2	1	0,9	0,42	0,04 - 4,81	0,6161	15	3,6	4	1,2	0,49	0,15 - 1,58	0,2909
	AA	1	0,6			NC	NC	NC					NC	NC	NC	1	0,2			NC	NC	NC
	GG	1	0,6										NC	NC	NC	3	0,7					
CC	GA			1	0,5	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,3	NC	NC	NC
	AA					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
A+	GG	128	69,6	157	73,4				53	63,1	94	76,4				317	64,4	276	75,6			
	GA	28	15,2	29	13,6	0,84	0,48 - 1,49	0,6624	15	17,8	20	16,3	0,75	0,36 - 1,59	0,5601	88	17,9	49	13,4	0,64	0,44 - 0,94	0,0280
	AA	1	0,5			NC	NC	NC	3	3,6			0,08	0,00 - 1,60	0,0503	6	1,2	1	0,3	0,19	0,02 - 1,60	0,1305
	GG	24	13,0	24	11,2				10	11,9	8	6,5				65	13,2	34	9,3			
C+	GA	2	1,0	4	1,9	2,00	0,33 - 11,97	0,6702	3	3,6	1	0,8	0,42	0,04 - 4,81	0,6161	15	3,0	5	1,4	0,64	0,21 - 1,90	0,4512
	AA	1	0,5			NC	NC	NC					NC	NC	NC	1	0,2			NC	NC	NC
A+	G+	156	98,7	186	99,5	NC	NC	NC	68	95,8	114	100,0	11,70	0,60 - 229,98	0,0551	405	97,8	325	99,4	4,81	0,58 - 41,20	0,1407
	A+	29	18,4	29	15,5	0,82	0,46 - 1,43	0,5634	18	25,3	20	17,5	0,63	0,30 - 1,29	0,2614	94	22,7	50	15,3	0,61	0,42 - 0,89	0,0115
	G+	26	16,5	28	15,0	NC	NC	NC	13	18,3	9	7,9	NC	NC	NC	80	19,3	39	11,9	NC	NC	NC
	A+	3	1,9	4	2,1	1,33	0,27 - 6,61	1	3	4,2	1	0,9	0,42	0,04 - 4,81	0,6161	16	3,9	5	1,5	0,60	0,20 - 1,77	0,4461
AA CA CC AA CA CC AA CA CC	GG	105	66,5	133	71,1				43	60,6	86	75,4				255	61,6	242	74,0			
		23	14,6	24	12,8	0,82	0,44 - 1,54	0,6307	10	14,1	8	7,0	0,40	0,15 - 1,09	0,0733	62	15,0	34	10,4	0,58	0,37 - 0,91	0,0189
		1	0,6			NC	NC	NC					NC	NC	NC	3	0,7			NC	NC	0,2493
		26	16,5	26	13,9				12	16,9	19	16,7				73	17,6	45	13,8			
	GA	2	1,3	3	1,6	1,50	0,23 - 9,73	1	3	4,2	1	0,9	0,21	0,02 - 2,27	0,2924	15	3,6	4	1,2	0,43	0,14 - 1,39	0,1997
				1	0,5	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,3	NC	NC	NC
									3	4,2						5	1,2	1	0,3			
	AA	1	0,6			NC	NC	NC					NC	NC	NC	1	0,2			NC	NC	NC
						NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
AA CA CC AA CA CC	G+	131	70,4	159	73,3				55	64,0	105	78,4				328	65,3	287	76,1			
		25	13,4	27	12,4	0,89	0,49 - 1,61	0,7630	13	15,1	9	6,7	0,36	0,15 - 0,90	0,0337	77	15,3	38	10,1	0,56	0,37 - 0,86	0,0078
		1	0,5	1	0,5	NC	NC	NC					NC	NC	NC	3	0,6	1	0,3	0,38	0,04 - 3,68	0,6274
		26	14,0	26	12,0				15	17,4	19	14,2				78	15,5	46	12,2			
	A+	3	1,6	3	1,4	1,00	0,18 - 5,42	1	3	3,5	1	0,7	0,26	0,02 - 2,79	0,3282	16	3,2	4	1,1	0,42	0,13 - 1,35	0,2051
CC			1	0,5	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,3	NC	NC	NC	
A+ C+ A+ C+	G+	156	98,7	186	99,5	NC	NC	NC	68	95,8	114	100,0	NC	NC	NC	405	97,8	325	99,4	2,41	0,25 - 23,25	0,6333
		26	16,5	28	15,0	0,89	0,50 - 1,59	0,7664	13	18,3	9	7,9	0,36	0,15 - 0,90	0,0337	80	19,3	39	11,9	0,56	0,37 - 0,84	0,0063
		29	18,4	29	15,5	NC	NC	NC	18	25,4	20	17,5	NC	NC	NC	94	22,7	50	15,3	NC	NC	NC
	A+	3	1,9	4	2,1	1,33	0,27 - 6,56	1	3	4,2	1	0,9	0,26	0,02 - 2,79	0,3282	16	3,9	5	1,5	0,53	0,18 - 1,54	0,3247

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; P - valor de P na comparação das frequências; NC - não calculado. Em negrito estão destacados os valores de P e OR significativos.

Tabela 19. Análise de interação entre rs13332630 (BCMA) e rs12938073 (TACI).

rs13332630 (BCMA)	rs12938073 (TACI)	EU							M							Am Total						
		C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
		n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%			
AA	AA	32	20,5	53	29,0				13	18,3	30	25,9				58	21,5	89	27,3			
	AT	62	39,7	73	39,9	0,71	0,41 - 1,24	0,2635	26	36,6	58	50,0	0,97	0,44 - 2,15	1	100	37,0	146	44,8	0,95	0,63 - 1,44	0,8323
	TT	36	23,1	31	16,9	0,52	0,27 - 1,00	0,0511	19	26,8	18	15,5	0,41	0,16 - 1,03	0,0689	63	23,3	53	16,3	0,55	0,33 - 0,90	0,0182
CA	AA	7	4,5	4	2,2				2	2,8	4	3,4				11	4,1	8	2,5			
	AT	11	7,1	17	9,3	2,70	0,64 - 11,46	0,2849	7	9,9	3	2,6	0,21	0,02 - 1,88	0,3024	22	8,1	22	6,7	1,38	0,46 - 4,07	0,5950
	TT	8	5,1	4	2,2	0,88	0,16 - 4,87	1	4	5,6	3	2,6	0,38	0,04 - 3,61	0,5921	16	5,9	7	2,1	0,60	0,17 - 2,15	0,5249
CC	AA																					
	AT			1	0,5	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,3	NC	NC	NC
	TT					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
A+	AA	39	21,4	57	27,4				15	17,9	34	27,0				69	21,6	97	26,7			
	AT	73	40,1	90	43,3	0,84	0,51 - 1,41	0,5198	33	39,3	61	48,4	0,82	0,39 - 1,71	0,7095	122	38,2	168	46,3	0,98	0,67 - 1,44	0,9218
	TT	44	24,2	35	16,8	0,54	0,30 - 0,99	0,0500	23	27,4	21	16,7	0,40	0,17 - 0,94	0,0378	79	24,8	60	16,5	0,54	0,34 - 0,85	0,0084
C+	AA	7	3,8	4	1,9				2	2,4	4	3,2				11	3,4	8	2,2			
	AT	11	6,0	18	8,7	2,86	0,68 - 12,08	0,1734	7	8,3	3	2,4	0,21	0,02 - 1,88	0,3024	22	6,9	23	6,3	1,44	0,49 - 4,24	0,5898
	TT	8	4,4	4	1,9	0,88	0,16 - 4,87	1	4	4,8	3	2,4	0,38	0,04 - 3,61	0,5921	16	5,0	7	1,9	0,60	0,17 - 2,15	0,5249
A+	A+	112	71,8	147	80,3	1,65	0,99 - 2,74	0,0545	48	67,6	95	8,2	2,17	1,09 - 4,30	0,0329	191	70,7	265	81,3	18,3	1,24 - 2,68	0,0025
	T+	117	75,0	125	68,3	0,73	0,45 - 1,18	0,2268	56	78,9	82	70,7	0,65	0,32 - 1,30	0,2351	201	74,4	228	69,9	0,81	0,56 - 1,16	0,2709
	A+	18	11,5	22	12,0	2,44	0,63 - 9,45	0,3238	9	12,7	7	6,0	1,04	0,17 - 6,23	1	33	12,2	31	9,5	2,15	0,78 - 5,92	0,1508
C+	T+	19	12,2	22	12,0	2,03	0,51 - 8,00	0,4986	11	15,5	6	5,2	0,27	0,04 - 1,95	0,3413	38	14,1	30	9,2	1,09	0,39 - 3,04	1
AA	AA	32	20,5	53	29,0				13	18,3	30	25,9				58	21,5	89	27,3			
	CA	7	4,5	4	2,2	0,35	0,09 - 1,27	0,1148	2	2,8	4	3,4	0,87	0,14 - 5,34	1	11	4,1	8	2,5	0,47	0,18 - 1,25	0,1430
	CC					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
AA	AA	62	39,7	73	39,9				26	36,6	58	50,0				100	37,0	146	44,8			
	CA	11	7,1	17	9,3	1,31	0,57 - 3,01	0,5400	7	9,9	3	2,6	0,19	0,05 - 0,80	0,0301	22	8,1	22	6,7	0,68	0,36 - 1,30	0,3199
	CC			1	0,5	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,3	NC	NC	NC
AA	AA	36	23,1	31	16,9				19	26,8	18	15,5				63	23,3	53	16,3			
	CA	8	5,1	4	2,2	0,58	0,16 - 2,12	0,5333	4	5,6	3	2,6	0,79	0,16 - 4,04	1	16	5,9	7	2,1	0,52	0,20 - 1,36	0,2494
	CC					NC	NC	NC					NC	NC	NC					NC	NC	NC
AA	AA	94	41,0	126	46,0				39	37,5	88	49,7				158	40,3	235	47,5			
	CA	18	7,8	21	7,7	0,87	0,44 - 1,72	0,7278	9	8,7	7	4,0	0,34	0,12 - 0,99	0,0517	33	8,4	30	6,1	0,61	0,36 - 1,04	0,0748
	CC			1	0,4	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,2	NC	NC	NC
AA	AA	98	42,8	104	38,0				45	43,3	76	42,9				163	41,6	199	40,2			
	CA	19	8,3	21	7,7	1,04	0,53 - 2,05	1	11	10,6	6	3,4	0,32	0,11 - 0,93	0,0371	38	9,7	29	5,9	0,63	0,37 - 1,06	0,0843
	CC			1	0,4	NC	NC	NC					NC	NC	NC			1	0,2	NC	NC	NC
A+	A+	112	71,8	147	80,3	NC	NC	NC	48	67,6	95	81,9	NC	NC	NC	191	70,7	265	81,3	NC	NC	NC
	C+	18	11,5	22	12,0	0,91	0,46 - 1,80	0,8627	9	12,7	7	6,0	0,34	0,12 - 0,99	0,0517	33	12,2	31	9,5	0,63	0,37 - 1,07	0,1012
	A+	117	75,0	125	68,3	NC	NC	NC	56	78,9	82	70,7	NC	NC	NC	201	74,4	228	69,9	NC	NC	NC
C+	T+	19	12,2	22	12,0	1,09	0,56 - 2,14	0,8647	11	15,5	6	5,2	0,32	0,11 - 0,93	0,0371	38	14,1	30	9,2	0,65	0,38 - 1,09	0,1125

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; P - valor de P na comparação das frequências; NC - não calculado. Em negrito estão destacados os valores de P e OR significativos.

Tabela 20. Análise de interação entre rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*).

rs11552708 (APRIL)	rs12938073 (TACI)	EU						M						Am Total								
		C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P	C		P		OR	IC	P
		n	%	n	%				n	%	n	%				n	%	n	%			
GG	AA	35	22,3	50	26,7				13	18,3	26	22,8				86	20,3	82	24,9			
	AT	59	37,6	75	40,1	0,89	0,51 - 1,54	0,7795	23	32,4	49	43,0	1,07	0,46 - 2,44	1	164	38,7	140	42,6	0,90	0,61 - 1,31	0,6302
	TT	33	21,0	30	16,0	0,64	0,33 - 1,23	0,1867	17	23,9	19	16,7	0,56	0,22 - 1,42	0,2462	86	20,3	53	16,1	0,65	0,41 - 1,02	0,0654
	AA	2	1,3	7	3,7				1	1,4	7	6,1				14	3,3	14	4,3			
GA	AT	16	10,2	18	9,6	0,32	0,06 - 1,78	0,2632	9	12,7	11	9,6	0,17	0,02 - 1,70	0,1937	42	9,9	29	8,8	0,69	0,29 - 1,66	0,5007
	TT	11	7,0	7	3,7	0,18	0,03 - 1,14	0,1032	5	7,0	2	1,8	0,06	0,00 - 0,82	0,0406	24	5,7	10	3,0	0,42	0,15 - 1,19	0,1208
	AA	1	0,6						1	1,4						3	0,7					
AA	AT					NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	3	0,7	1	0,3	NC	NC	NC
	TT					NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	2	0,5			NC	NC	NC
G+	AA	37	19,9	57	26,0				14	16,3	33	24,6				100	19,8	96	25,1			
	AT	75	40,3	93	42,5	0,80	0,48 - 1,34	0,4366	32	37,2	60	44,8	0,80	0,37 - 1,70	0,5747	206	40,9	169	44,2	0,85	0,60 - 1,21	0,3784
	TT	44	23,7	37	16,9	0,55	0,30 - 1,00	0,0503	22	25,6	21	15,7	0,41	0,17 - 0,96	0,0528	110	21,8	63	16,5	0,60	0,39 - 0,91	0,0158
A+	AA	3	1,6	7	3,2				2	2,3	7	5,2				17	3,4	14	3,7			
	AT	16	8,6	18	8,2	0,48	0,11 - 2,18	0,4744	10	11,6	11	8,2	0,31	0,05 - 1,88	0,2487	45	8,9	30	7,9	0,81	0,35 - 1,88	0,6684
	TT	11	5,7	7	3,2	0,27	0,05 - 1,42	0,2365	6	7,0	2	1,5	0,10	0,01 - 0,90	0,0567	26	5,2	10	2,6	0,47	0,17 - 1,29	0,2016
G+	A+	112	71,3	150	80,2	1,59	0,97 - 2,63	0,0746	46	64,8	93	81,6	2,12	1,06 - 4,24	0,0465	306	72,2	265	80,5	1,51	1,06 - 2,15	0,0230
	T+	119	75,8	130	69,5	0,71	0,44 - 1,15	0,1819	54	76,1	81	71,1	0,64	0,31 - 1,30	0,2264	316	74,5	232	70,5	0,76	0,55 - 1,06	0,1120
	A+	19	12,1	25	13,4	2,07	0,67 - 6,34	0,2658	12	16,9	18	15,8	4,50	0,77 - 26,13	0,1171	62	14,6	44	13,4	1,85	0,81 - 4,21	0,1673
A+	T+	27	17,2	25	13,4	0,40	0,09 - 1,71	0,3035	16	22,5	13	11,4	0,23	0,04 - 1,31	0,1305	71	16,7	40	12,2	0,68	0,31 - 1,53	0,4051
GG	AA	35	22,3	50	26,7				13	18,3	26	22,8				86	20,3	82	24,9			
		2	1,3	7	3,7	2,45	0,48 - 12,50	0,3131	1	1,4	7	6,1	3,50	0,39 - 31,54	0,4048	14	3,3	14	4,3	1,05	0,47 - 2,33	1
		1	0,6			NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	3	0,7			NC	NC	0,2469
		59	37,6	75	40,1				23	32,4	49	43,0				164	38,7	140	42,6			
		16	10,2	18	9,6	0,89	0,42 - 1,88	0,8473	9	12,7	11	9,6	0,57	0,21 - 1,58	0,2988	42	9,9	29	8,8	0,81	0,48 - 1,37	0,5080
	AT					NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	3	0,7	1	0,3	0,39	0,04 - 3,80	0,6279
		33	21,0	30	16,0				17	23,9	19	16,7				86	20,3	53	16,1			
		11	7,0	7	3,7	0,70	0,24 - 2,04	0,5971	5	7,0	2	1,8	0,36	0,06 - 2,09	0,4121	24	5,7	10	3,0	0,68	0,30 - 1,52	0,4279
						NC	NC	NC	1	1,4			NC	NC	NC	2	0,5			NC	NC	0,5275
GA	A+	94	40,5	125	44,6				36	34,6	75	43,1				250	39,5	222	44,5			
		18	7,8	25	8,9	1,04	0,54 - 2,03	1	10	9,6	18	10,3	0,86	0,36 - 2,06	0,8230	56	8,8	43	8,6	0,86	0,56 - 1,34	0,5797
		1	0,4			NC	NC	NC	2	1,9			NC	NC	NC	6	0,9	1	0,2	0,19	0,02 - 1,57	0,1285
	92	39,7	105	37,5				40	38,5	68	39,1				250	39,5	193	38,7				
	T+	27	11,6	25	8,9	0,81	0,44 - 1,50	0,5350	14	13,5	13	7,5	0,55	0,23 - 1,28	0,1901	66	10,4	39	7,8	0,77	0,49 - 1,19	0,2720
AA					NC	NC	NC	2	1,9			NC	NC	NC	5	0,8	1	0,2	0,26	0,03 - 2,24	0,2416	
G+	A+	112	71,3	150	80,2	NC	NC	NC	46	64,8	93	81,6	NC	NC	NC	306	72,2	265	80,5	5,20	0,62 - 43,44	0,1311
		19	12,1	25	13,4	0,99	0,51 - 1,90	1	12	16,9	18	15,8	0,72	0,31 - 1,65	0,5158	62	14,6	44	13,4	0,80	0,52 - 1,22	0,3325
		119	75,8	130	69,5	NC	NC	NC	54	76,1	81	71,1	NC	NC	NC	316	74,5	232	70,5	3,67	0,43 - 31,63	0,2516
		27	17,2	25	13,4	0,81	0,44 - 1,50	0,5350	16	22,5	13	11,4	0,48	0,21 - 1,10	0,0912	71	16,7	40	12,2	0,73	0,47 - 1,12	0,1631

EU - indivíduos de origem predominantemente europeia; M - indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e europeia; C - controles; P - pacientes; n - número de indivíduos; % - porcentagem de indivíduos; OR - *odds ratio*; IC - intervalo de confiança; *P* - valor de *P* na comparação das frequências; NC - não calculado. Em negrito estão destacados os valores de *P* e OR significativos.

Como já comentado, para o SNP rs4421862 (*BAFF*), foi observada uma associação apenas no subgrupo M, sendo que o subgrupo EU teve tendência de associação no sentido oposto (Tabela 7 e Figura 11). Além disso, a análise de interação mostrou que quando estratificamos pacientes e controles de acordo com seu genótipo em rs4421862 (*BAFF*), os efeitos de outros SNPs, especialmente de rs11552708 (*APRIL*) e de rs12938073 (*TACI*), ocorrem em diferentes estratos nos subgrupos M e EU (Tabelas 16 e 17). Uma das possíveis explicações para resultados diferentes entre os dois subgrupos com origens étnicas distintas seria o desequilíbrio de ligação distinto na região. Por isso, foi realizada uma análise com a ferramenta SNAP (JOHNSON *et al.*, 2008) para visualização dos padrões de desequilíbrio de ligação observados na região do SNP rs4421862 (*BAFF*) em diferentes grupos étnicos (Figuras 15 a 18). Pode-se observar que na população africana utilizada (Yoruba) não há nenhum SNP em 500kb que apresente r^2 maior que 0,6 com rs4421862. O SNP que aparece com o maior desequilíbrio de ligação com rs4421862 é o rs73611008 (*BAFF*), com r^2 de 0,52 e D' de 1. Este SNP, não genotipado no presente estudo, está localizado à menos de 500pb de rs4421862, também no íntron 3. Na população europeia disponível na ferramenta SNAP, o SNP rs73611008 não aparecia em desequilíbrio de ligação com rs4421862 (*BAFF*). Por isso, a frequência dos alelos de rs73611008 foi verificada em diferentes populações nos dados do projeto 1000 genomas (disponível em: <http://browser.1000genomes.org/index.html>). Foi verificado que populações europeias têm uma frequência bem baixa do alelo G, com um máximo de 5%, enquanto que populações africanas apresentam este alelo com no mínimo 12% e até 27% de frequência (Figura 19). Isso poderia sugerir que a associação observada para rs4421862 (*BAFF*) no presente estudo apenas no subgrupo M é, na verdade, um reflexo do efeito do SNP rs73611008, não observado no subgrupo EU por consequência de uma frequência muito baixa de um dos seus alelos.

Este SNP, rs73611008 (*BAFF*), assim como os SNPs associados, rs4421862 (*BAFF*), rs13332630 (*BCMA*), rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*), foram avaliados quanto a inferências de consequências funcionais, utilizando a ferramenta HaploReg (WARD e KELLIS, 2012). Esta ferramenta mostra para o SNP investigado, assim como para SNPs em desequilíbrio de ligação com este, a conservação entre mamíferos da posição do SNP, dados de epigenética, expressão e ligação de fatores de transcrição. Os resultados (Figuras 20 a 24) mostram que todos eles podem levar a pelo

menos uma destas alterações funcionais, sendo que no caso do SNP rs11552708 (*APRIL*), quase todos os parâmetros mostram algum resultado, indicando que ele seja realmente um SNP funcional.

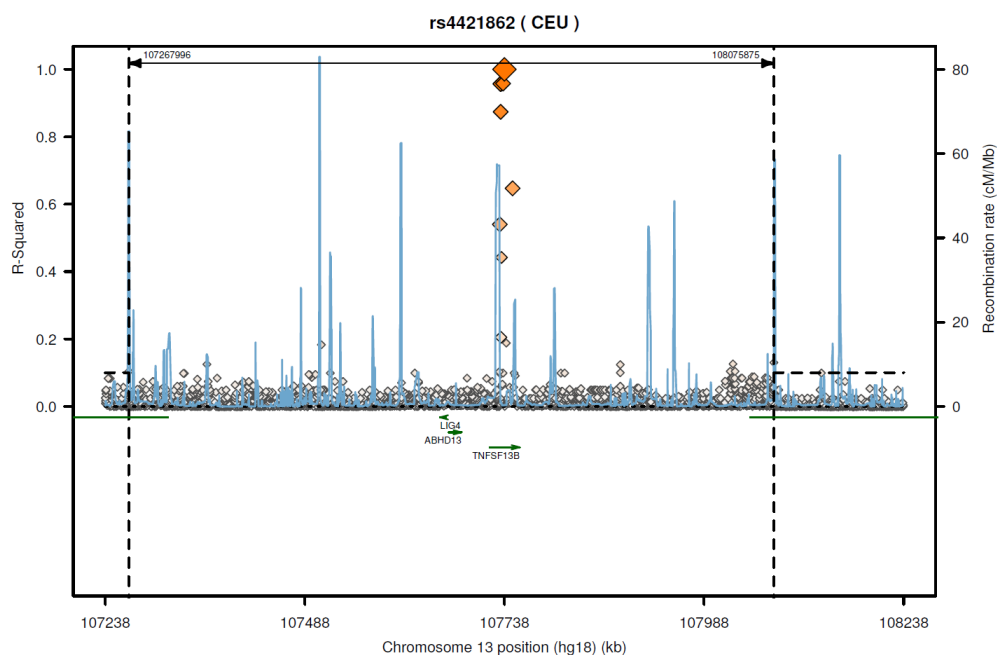


Figura 15. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 (*BAFF*) em população europeia, numa região de 500kb. O losango maior representa o próprio rs4421862 e os demais losangos representam SNPs em desequilíbrio de ligação com este. As linhas azuis representam as taxas de recombinação e as setas verdes representam os genes desta região. FONTE: figura gerada com a ferramenta online SNAP (JOHNSON et al., 2008), disponível em <https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>.

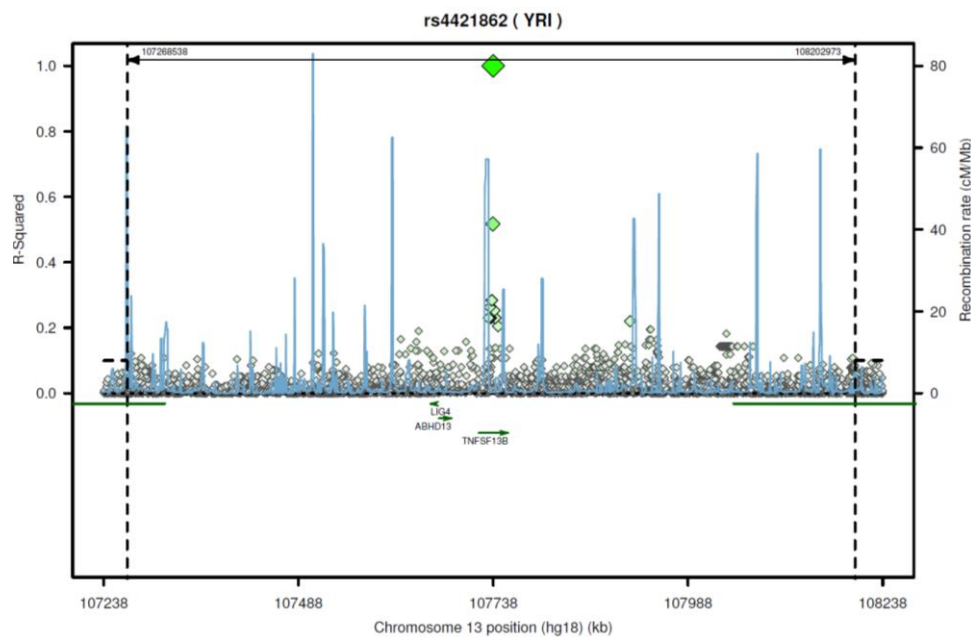


Figura 16. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 (*BAFF*) em população africana, numa região de 500kb. O losango maior representa o próprio rs4421862 e os demais losangos representam SNPs em desequilíbrio de ligação com este. As linhas azuis representam as taxas de recombinação e as setas verdes representam os genes desta região. FONTE: figura gerada com a ferramenta *online* SNAP (JOHNSON *et al.*, 2008), disponível em <https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>.

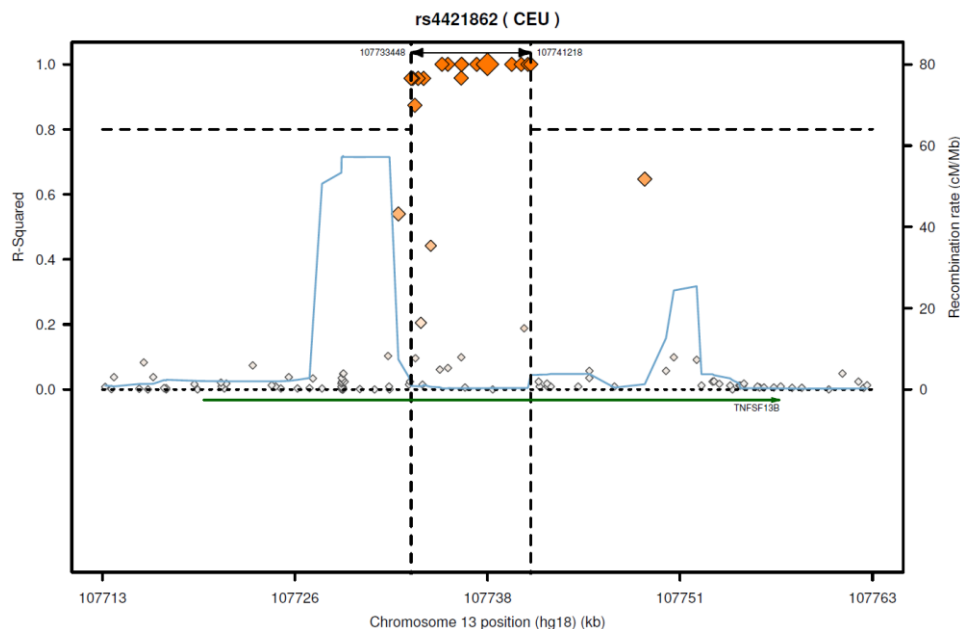


Figura 17. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 (*BAFF*) em população europeia, numa região de 25kb. O losango maior representa o próprio rs4421862 e os demais losangos representam SNPs em desequilíbrio de ligação com este. As linhas azuis representam as taxas de recombinação e as setas verdes representam os genes desta região. FONTE: figura gerada com a ferramenta *online* SNAP (JOHNSON *et al.*, 2008), disponível em <https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>.

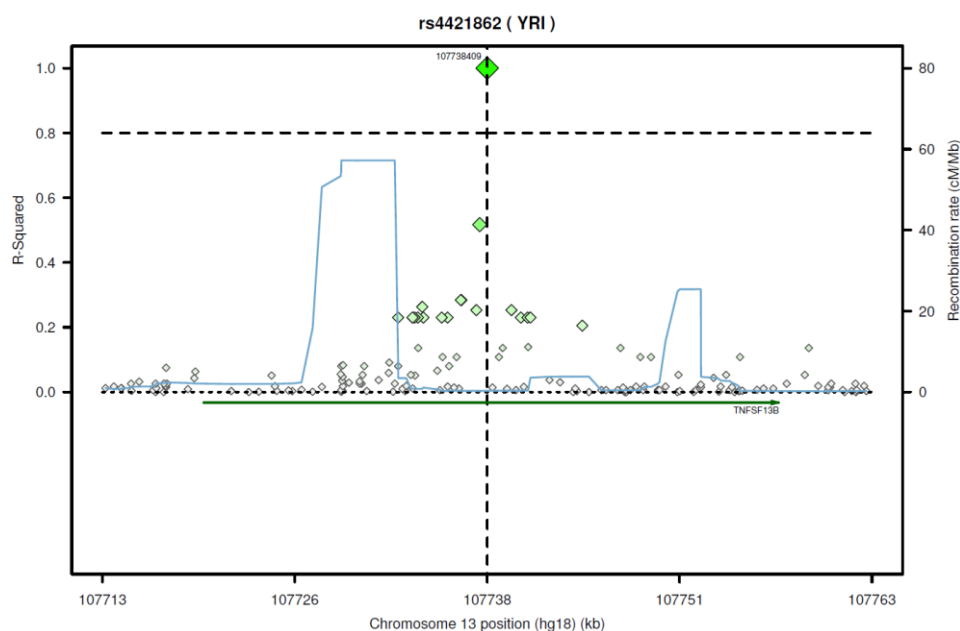


Figura 18. SNPs em desequilíbrio de ligação com rs4421862 (*BAFF*) em população africana, numa região de 25kb. O losango maior representa o próprio rs4421862 e os demais losangos representam SNPs em desequilíbrio de ligação com este. As linhas azuis representam as taxas de recombinação e as setas verdes representam os genes desta região. FONTE: figura gerada com a ferramenta *online* SNAP (JOHNSON *et al.*, 2008), disponível em <https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldplot.php>.

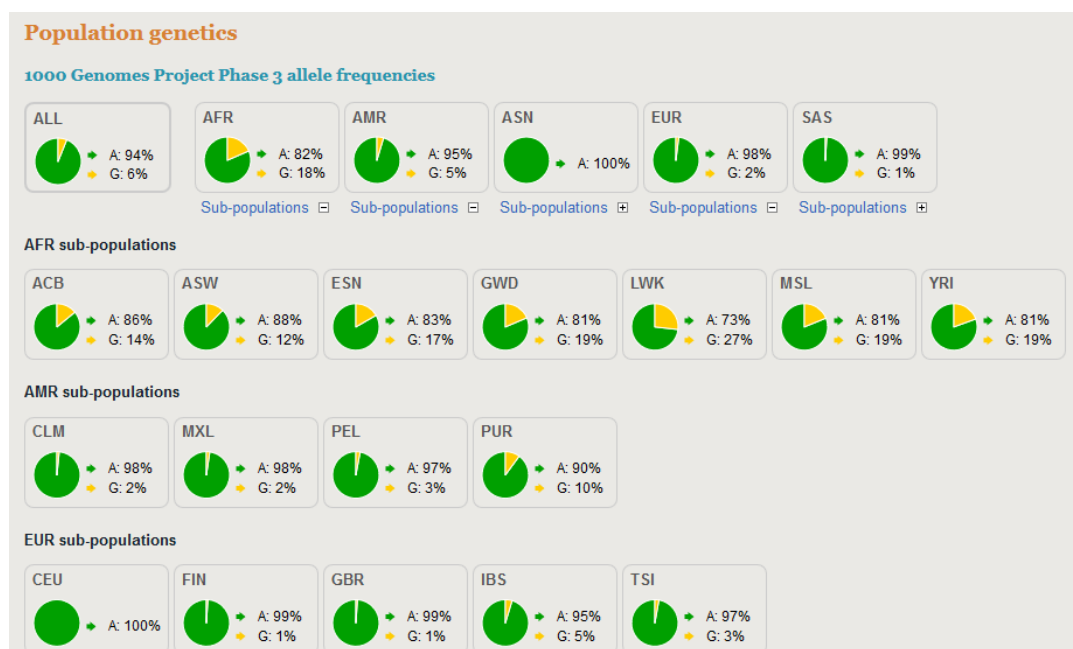


Figura 19. Frequências do SNP rs73611008 (*BAFF*) em diferentes populações. FONTE: navegador do projeto 1000 genomas, disponível em <http://browser.1000genomes.org/index.html>, acesso m 26 de junho de 2015.

A

Query SNP: **rs4421862** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted
chr13:108935447	chr13:108283099	0.87	0.97	rs16972217	C	T	0.09	0.40	0.43	0.22			FAT	ESC, BLD	MUS			HNF1,PLZF	
chr13:108935557	chr13:108283209	0.87	0.97	rs16972220	G	A	0.09	0.40	0.43	0.22			FAT	ESC, BLD	MUS,MUS,MUS,BRN			Hoxd8,Mef2,Nanog,Sox	
chr13:108935689	chr13:108283341	0.88	0.97	rs16972222	A	G	0.10	0.40	0.44	0.23				ESC, FAT, BLD	6 organs	CEBPB		CEBPA,CEBPB,Hst,TEF	CEBPB_3,Enh_c153;CEBPB_4,Enh_c153;CEBPD_2,Enh_c153;CEBPE_1,Enh_c153;CEBPG_2,Enh_c153;CEBPG_3,Enh_c153;CEBP_2,Enh_c153
chr13:108935902	chr13:108283554	0.88	0.97	rs7993590	A	T	0.09	0.40	0.43	0.23			FAT	BLD, STRM				AP-1,YY1	
chr13:108936262	chr13:108283914	0.88	0.97	rs7995847	T	C	0.09	0.40	0.43	0.23				BLD				EBF,STAT	
chr13:108936448	chr13:108284100	0.87	0.96	rs58030029	T	C	0.10	0.40	0.43	0.23								8 altered motifs	
chr13:108937452	chr13:108285104	0.92	1	rs12583006	T	A	0.09	0.40	0.44	0.22				ESC				Zbtb3	
chr13:108937833	chr13:108285485	0.92	1	rs11069727	A	G	0.09	0.40	0.44	0.22								GR,Hmx	
chr13:108938697	chr13:108286349	0.82	0.91	rs12583239	T	C	0.09	0.41	0.44	0.24								Foxp1,Maf,Pou2f2	
chr13:108938721	chr13:108286373	0.91	1	rs12583240	T	G	0.09	0.40	0.44	0.22								HDAC2,Irf,TEF	
chr13:108938727	chr13:108286379	0.91	1	rs12583251	T	A	0.09	0.40	0.44	0.22								Foxp3,HNF1,Mef2,Mrg1:Hoxa9	
chr13:108938976	chr13:108286628	0.91	1	rs34506170	CAT	C	0.09	0.40	0.41	0.22								Foxa,Foxl1,Mef2,TATA	
chr13:108938984	chr13:108286636	0.77	1	rs199556498	TAA	T	0.09	0.32	0.38	0.19								9 altered motifs	
chr13:108939705	chr13:108287357	0.92	1	rs12428930	A	C	0.07	0.40	0.43	0.22								E2F,Msx-1	
chr13:108940408	chr13:108288060	1	1	rs4421862	G	A	0.30	0.44	0.41	0.24								10 altered motifs	
chr13:108941982	chr13:108289634	0.93	1	rs1020192	T	A	0.10	0.41	0.44	0.22								Foxl1,Pou2f2,TATA,TEF	
chr13:108942596	chr13:108290248	0.91	1	rs2391631	A	G	0.09	0.39	0.41	0.22				BLD, GI				DMRT2	
chr13:108943034	chr13:108290686	0.9	0.99	rs2893321	A	G	0.09	0.39	0.41	0.22								HNF1,Lhx3,OTX,Obox6,Sox	
chr13:108943217	chr13:108290869	0.9	0.99	rs4000607	C	A	0.09	0.39	0.41	0.22								HNF1,Mrg1:Hoxa9	
chr13:108944407	chr13:108292059	0.9	0.99	rs5806723	ACT	A	0.08	0.39	0.41	0.22								Myb,PRDM1,Pax-4,ZBTB33	

B

Query SNP: **rs4421862** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr13:108939922	chr13:108287574	0.61	1	rs73611008	A	G	0.21	0.05	0.00	0.01								10 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108940408	chr13:108288060	1	1	rs4421862	G	A	0.30	0.44	0.41	0.24								10 altered motifs		TNFSF13B	intronic

Figura 20. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs4421862 (BAFF). A) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população europeia. B) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população africana. Esta ferramenta mostra para o SNP buscado, assim como para aqueles em desequilíbrio de ligação com este, a posição no cromossomo, os valores de D' e r^2 para o desequilíbrio de ligação, o código rs, os alelos possíveis, as frequências de um destes alelos em diversas populações, se esta posição é conservada em mamíferos (de acordo com algoritmos GERP e SiPhy), se há evidências desta região ter diferentes estados regulatórios de cromatina (em vermelho e laranja), se há evidência da ligação de proteínas na região (em cinza e verde), se há evidência de alteração na expressão gênica associada com diferentes alelos do SNP e se há evidência de alteração do motivo de ligação de proteínas de acordo com o alelo (em rosa). FONTE: HaploReg v3 (WARD e KELLIS, 2012), disponível em http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php, acesso em 26 de junho de 2015.

A

Query SNP: **rs73611008** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr13:108934898	chr13:108282550	0.91	1	rs111934182	G	T	0.03	0.03	0.00	0.01				BLD				17 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108935791	chr13:108283443	1	1	rs112614544	A	G	0.04	0.04	0.00	0.01				ESC, FAT, BLD				GR,Meft2		TNFSF13B	intronic
chr13:108939922	chr13:108287574	1	1	rs73611008	A	G	0.21	0.05	0.00	0.01								10 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108941695	chr13:108289347	1	1	rs73611009	C	T	0.05	0.04	0.00	0.01				IPSC, GI, SPLN	IPSC, BRN			ERalpha-a.Pbx3		TNFSF13B	intronic
chr13:108943068	chr13:108290720	1	1	rs61092568	C	T	0.18	0.04	0.00	0.01								6 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108946242	chr13:108293894	1	1	rs73611013	T	C	0.06	0.04	0.00	0.01								AP-1,FXR		TNFSF13B	intronic
chr13:108946590	chr13:108294242	1	1	rs7985994	T	C	0.24	0.05	0.00	0.01								Pdx1		TNFSF13B	intronic
chr13:108949447	chr13:108297099	1	1	rs59103320	T	G	0.07	0.04	0.00	0.01								10 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108949986	chr13:108297638	1	1	rs73611016	T	G	0.07	0.04	0.00	0.01								9 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108952768	chr13:108300420	0.82	1	rs73611020	C	T	0.05	0.04	0.00	0.01								lrf,Maf		TNFSF13B	intronic

B

Query SNP: **rs73611008** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr13:108939922	chr13:108287574	1	1	rs73611008	A	G	0.21	0.05	0.00	0.01								10 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108940408	chr13:108288060	0.61	1	rs4421862	G	A	0.30	0.44	0.41	0.24								10 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108943068	chr13:108290720	0.81	0.97	rs61092568	C	T	0.18	0.04	0.00	0.01								6 altered motifs		TNFSF13B	intronic
chr13:108946590	chr13:108294242	0.82	0.97	rs7985994	T	C	0.24	0.05	0.00	0.01								Pdx1		TNFSF13B	intronic

Figura 21. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs73611008 (BAFF). A) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população europeia. B) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população africana. Esta ferramenta mostra para o SNP buscado, assim como para aqueles em desequilíbrio de ligação com este, a posição no cromossomo, os valores de D' e r^2 para o desequilíbrio de ligação, o código rs, os alelos possíveis, as frequências de um destes alelos em diversas populações, se esta posição é conservada em mamíferos (de acordo com algoritmos GERP e SiPhy), se há evidências desta região ter diferentes estados regulatórios de cromatina (em laranja), se há evidência da ligação de proteínas na região (em cinza), se há evidência de alteração na expressão gênica associada com diferentes alelos do SNP e se há evidência de alteração do motivo de ligação de proteínas de acordo com o alelo (em rosa). FONTE: HaploReg v3 (WARD e KELLIS, 2012), disponível em http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php, acesso em 26 de junho de 2015.

A

Query SNP: **rs11552708** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr17:7438864	chr17:7535547	0.71	0.95	rs112958256	C	T	0.17	0.07	0.01	0.09								SZF1-1		1.5kb 3' of Y_RNA	
chr17:7439270	chr17:7535953	0.71	0.95	rs62059794	G	A	0.17	0.07	0.01	0.09								E2F,NF-E2		1.1kb 3' of Y_RNA	
chr17:7439786	chr17:7536469	0.65	0.94	rs139440301	TG	T	0.18	0.07	0.01	0.08								6 altered motifs		626bp 3' of Y_RNA	
chr17:7439841	chr17:7536524	0.73	0.95	rs75560110	T	C	0.17	0.07	0.01	0.09								Mef2,NF-kappaB,SIX5		571bp 3' of Y_RNA	
chr17:7440111	chr17:7536794	0.73	0.95	rs78009957	T	C	0.03	0.05	0.01	0.09								8 altered motifs		301bp 3' of Y_RNA	
chr17:7441757	chr17:7538440	0.73	0.95	rs72827540	G	A	0.18	0.07	0.14	0.09						KAP1		BATF,Bach1		1.2kb 5' of Y_RNA	
chr17:7441776	chr17:7538459	0.73	0.95	rs60855753	G	T	0.18	0.07	0.14	0.09						KAP1		7 altered motifs		1.3kb 5' of Y_RNA	
chr17:7443415	chr17:7540098	0.67	0.87	rs202196704	TAA	T	0.18	0.07	0.14	0.09								19 altered motifs		2.9kb 5' of Y_RNA	
chr17:7443740	chr17:7540423	0.75	0.97	rs61416196	G	A	0.04	0.05	0.13	0.09								Pax-5		3.2kb 5' of Y_RNA	
chr17:7444206	chr17:7540889	0.75	0.97	rs28583655	G	A	0.18	0.07	0.14	0.09										3.7kb 5' of Y_RNA	
chr17:7445402	chr17:7542085	0.75	0.97	rs62059798	C	T	0.03	0.05	0.17	0.09								Rad21,YY1		4.9kb 5' of Y_RNA	
chr17:7445509	chr17:7542192	0.75	0.97	rs62059799	C	T	0.03	0.05	0.14	0.09								SZF1-1,Spz1,ZBTB33		5kb 5' of Y_RNA	
chr17:7446043	chr17:7542726	0.75	0.97	rs77713305	C	T	0.03	0.05	0.14	0.09				BLD, LIV	LNG			6 altered motifs		5.5kb 5' of Y_RNA	
chr17:7447636	chr17:7544319	0.75	0.97	rs78002826	C	T	0.04	0.05	0.14	0.09				LIV, ADRL, OVRY, HRT	LNG			Foxd1		4.6kb 5' of TNFSF12	
chr17:7447764	chr17:7544447	0.75	0.97	rs9899326	G	A	0.17	0.06	0.14	0.09				LIV, ADRL, OVRY, HRT	LIV			ERalpha-a,Esr2		4.4kb 5' of TNFSF12	
chr17:7447854	chr17:7544537	0.75	0.97	rs9907930	T	G	0.17	0.06	0.14	0.09				ADRL, OVRY, HRT, MUS, LIV				GR,Nlx2		4.4kb 5' of TNFSF12	
chr17:7448573	chr17:7545256	0.75	0.97	rs62059800	G	A	0.01	0.05	0.00	0.09				ADRL, OVRY, MUS				Ik-1,SETDB1,Sin3Ak-20		3.6kb 5' of TNFSF12	
chr17:7448642	chr17:7545325	0.75	0.97	rs28723678	C	T	0.18	0.06	0.14	0.09								SZF1-1,Spz1,ZBTB33		3.6kb 5' of TNFSF12	
chr17:7452542	chr17:7549225	0.77	0.97	rs77711855	C	T	0.17	0.06	0.14	0.09			24 organs	IPSC, BRN, HRT, THYM, BLD	22 organs	CTCF		BCL,SETDB1,Sin3Ak-20,Zfx		TNFSF12	synonymous
chr17:7454528	chr17:7551211	0.78	0.98	rs3803796	C	G	0.05	0.05	0.15	0.09			GI, LIV	6 organs				Nanog,Nrf1		TNFSF12	intronic
chr17:7456344	chr17:7553027	0.73	1	rs189650944	T	C	0.04	0.05	0.13	0.08			BLD	BLD, SKIN, FAT, GI, THYM	8 organs	EBF1,PU1,NFKB		6 altered motifs		TNFSF12	intronic
chr17:7457864	chr17:7554547	0.81	1	rs113924794	C	T	0.04	0.05	0.14	0.09				BLD				CTCF,ERalpha-a,RXRa,T3R		TNFSF12	intronic
chr17:7460758	chr17:7557441	0.81	1	rs28362665	G	A	0.03	0.05	0.14	0.09			IPSC, BLD, SKIN, GI, LIV	17 organs	12 organs	RAD21,USF1		BCL,BHLHE40,Pou2f2,Rad21,Sin3Ak-20		TNFSF12	3'-UTR
chr17:7462555	chr17:7559238	1	1	rs11552708	G	A	0.07	0.15	0.37	0.11			15 organs	17 organs	6 organs			9 altered motifs		TNFSF13	missense
chr17:7469591	chr17:7566274	0.81	1	rs62059821	G	A	0.01	0.05	0.00	0.09					LNG,SKIN			BCL,PEBP		SEN3	intronic
chr17:7469607	chr17:7566290	0.86	0.94	rs72827565	G	A	0.03	0.06	0.15	0.10				ESDR	LNG,SKIN			7 altered motifs		SEN3	intronic
chr17:7470560	chr17:7567242	0.86	0.94	rs62059822	G	A	0.03	0.06	0.15	0.10				ESDR, BLD				Mtf1		SEN3	intronic
chr17:7476493	chr17:7573175	0.88	0.96	rs62059823	G	C	0.02	0.06	0.15	0.10			24 organs	9 organs	23 organs	POL2,INI1,POL24H8		EWRS1-FLI1,Nanog,Sox		EIF4A1	intronic
chr17:7478213	chr17:7574895	0.88	0.96	rs62059824	C	T	0.01	0.06	0.15	0.10				23 organs	9 organs	POL2		GR,Pou2f2,THAP1,YY1		EIF4A1	intronic
chr17:7487573	chr17:7584255	0.88	0.96	rs72827584	C	T	0.01	0.06	0.15	0.10			24 organs	BLD, SKIN	40 organs	BCLAF1,MXI1,TBP,STAT3		Hic1,Pou2f2		MPDU1	intronic
chr17:7498271	chr17:7594953	0.88	0.96	rs72827590	A	G	0.01	0.06	0.15	0.10								Foxp1,Maf,Mef2		FXR2	intronic
chr17:7503319	chr17:7600001	0.68	0.89	rs112715785	G	A	0.03	0.07	0.07	0.12										FXR2	intronic
chr17:7527946	chr17:7624628	0.75	0.97	rs62059837	A	C	0.01	0.05	0.00	0.09				LIV				Foxj2,Gli1		SHBG	intronic
chr17:7528688	chr17:7625370	0.8	0.91	rs62059838	G	A	0.01	0.06	0.14	0.10				LIV, GI				FEV,FXR,RXRa,STAT		SHBG	intronic
chr17:7533214	chr17:7629896	0.76	0.89	rs3760213	G	A	0.01	0.06	0.14	0.10			SKIN, LIV	ESDR, LIV, GI, ADRL	GI	HDAC2,P300,RXRa,SP1		lrf,Pou2f2,TATA		SHBG	intronic
chr17:7536527	chr17:7633209	0.73	0.86	rs6259	G	A	0.01	0.06	0.14	0.11				ESC, BRN, SKIN, LIV, HRT	ESC,HRT,KID	CTCF,RAD21,HNF4A		EBF,Foxp3		SHBG	missense

B

Query SNP: **rs11552708** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr17:7462555	chr17:7559238	1	1	rs11552708	G	A	0.07	0.15	0.37	0.11								9 altered motifs		TNFSF13	missense

Figura 23. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs11552708 (APRIL). A) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população europeia. B) Considerando SNPs m desequilíbrio de ligação em população africana. Esta ferramenta mostra para o SNP buscado, assim como para aqueles em desequilíbrio de ligação com este, a posição no cromossomo, os valores de D' e r^2 para o desequilíbrio de ligação, o código rs, os alelos possíveis, as frequências de um destes alelos em diversas populações, se esta posição é conservada em mamíferos (de acordo com algoritmos GERP e SiPhy, em azul e roxo), se há evidências desta região ter diferentes estados regulatórios de cromatina (em vermelho e laranja), se há evidência da ligação de proteínas na região (em cinza e verde), se há evidência de alteração na expressão gênica associada com diferentes alelos do SNP e se há evidência de alteração do motivo de ligação de proteínas de acordo com o alelo (em rosa).
 FONTE: HaploReg v3 (WARD e KELLIS, 2012), disponível em http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php, acesso m 26 de junho de 2015.

A

Query SNP: **rs12938073** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr17:16827020	chr17:16923706	0.63	0.89	rs4792796	G	C	0.53	0.48	0.72	0.36				PANC				GR,ZBTB7A		5.8kb 3' of TNFRSF13B	
chr17:16832370	chr17:16929056	0.62	0.9	rs3794775	A	G	0.53	0.48	0.71	0.35				10 organs	BLD,THYM			E2A,HDAC2,Lmo2-complex,TCF12,ZEB1	MESP1_1,Enh_c39,TCF4_1,Enh_c39,TCF4_2,Enh_c39	478bp 3' of TNFRSF13B	
chr17:16833755	chr17:16930441	0.64	0.91	rs3829585	A	G	0.53	0.47	0.71	0.35				ESDR, SKIN	OVRY			LBP-9,Rad21,Znf143		TNFRSF13B	
chr17:16838730	chr17:16935416	0.78	0.98	rs55898532	A	G	0.63	0.53	0.79	0.36				ADRL, MUS	ADRL,BLD,MUS,BRN	FOSL2		8 altered motifs	RARG_5,Enh_c195	TNFRSF13B	
chr17:16842912	chr17:16939598	0.8	0.99	rs11078355	A	G	0.60	0.55	0.79	0.37				ESC, ESDR, IPSC, THYM, BLD	BLD			6 altered motifs		TNFRSF13B	synonymous
chr17:16845458	chr17:16942144	0.88	1	rs4791698	G	A	0.51	0.47	0.59	0.38				FAT, MUS				Mef2,p300		TNFRSF13B	intronic
chr17:16845467	chr17:16942153	0.88	1	rs4792801	T	C	0.54	0.47	0.59	0.38				FAT, MUS				7 altered motifs		TNFRSF13B	intronic
chr17:16846155	chr17:16942841	1	1	rs12938061	T	C	0.56	0.56	0.79	0.41				GI, MUS, LNG, LIV	10 organs			9 altered motifs	RARB_4,Enh_c22	TNFRSF13B	intronic
chr17:16846176	chr17:16942862	1	1	rs12938073	A	C	0.56	0.56	0.79	0.41				GI, MUS, LNG, LIV	9 organs			HNF4,Nanog,TAL1,YY1		TNFRSF13B	intronic
chr17:16846298	chr17:16942984	0.98	1	rs11078357	T	C	0.67	0.56	0.79	0.41				6 organs	BLD,MUS	POL2		Nkx2		TNFRSF13B	intronic
chr17:16846797	chr17:16943483	0.98	1	rs10852841	T	C	0.59	0.55	0.79	0.41								ERalpha-a,Pbx3,T3R,VDR,Zbtb3		TNFRSF13B	intronic
chr17:16850323	chr17:16947009	0.88	1	rs9893403	A	G	0.59	0.53	0.79	0.38				BLD, BRN, LNG	LNG			Cphx,HEY1,TATA		TNFRSF13B	intronic
chr17:16851342	chr17:16948028	0.87	1	rs11656532	C	T	0.32	0.44	0.64	0.38				BLD, BRN				GR,HDAC2,Zfp105		TNFRSF13B	intronic
chr17:16851834	chr17:16948520	0.75	1	rs3818716	C	T	0.25	0.40	0.63	0.35			BRN	BLD, BRN	BLD	ZEB1				TNFRSF13B	intronic
chr17:16852027	chr17:16948713	0.75	1	rs2274892	T	G	0.28	0.41	0.63	0.35					BLD			SIX5		TNFRSF13B	intronic
chr17:16854546	chr17:16951232	0.87	1	rs11651242	G	T	0.64	0.53	0.79	0.38					BLD			GR		TNFRSF13B	intronic
chr17:16855215	chr17:16951901	0.86	-0.98	rs68065334	TA	T	0.54	0.53	0.28	0.61								21 altered motifs		TNFRSF13B	intronic
chr17:16855221	chr17:16951907	0.87	-1	rs55857815	TA	T	0.52	0.53	0.28	0.62								13 altered motifs		TNFRSF13B	intronic
chr17:16857425	chr17:16954111	0.86	-0.99	rs8078529	G	A	0.28	0.49	0.30	0.62				BLD, BRN, THYM				ERalpha-a,MIF-1,Rad21,SETDB1		TNFRSF13B	intronic

B

Query SNP: **rs12938073** and variants with $r^2 \geq 0.6$

pos (hg19)	pos (hg38)	LD (r ²)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	GERP cons	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	eQTL tissues	Motifs changed	Drivers disrupted	GENCODE genes	dbSNP func annot
chr17:16842912	chr17:16939598	0.69	0.91	rs11078355	A	G	0.60	0.55	0.79	0.37				ESC, ESDR, IPSC, THYM, BLD	BLD			6 altered motifs		TNFRSF13B	synonymous
chr17:16845458	chr17:16942144	0.82	1	rs4791698	G	A	0.51	0.47	0.59	0.38				FAT, MUS				Mef2,p300		TNFRSF13B	intronic
chr17:16845467	chr17:16942153	0.92	1	rs4792801	T	C	0.54	0.47	0.59	0.38				FAT, MUS				7 altered motifs		TNFRSF13B	intronic
chr17:16846155	chr17:16942841	1	1	rs12938061	T	C	0.56	0.56	0.79	0.41				GI, MUS, LNG, LIV	10 organs			9 altered motifs	RARB_4,Enh_c22	TNFRSF13B	intronic
chr17:16846176	chr17:16942862	1	1	rs12938073	T	A	0.56	0.56	0.79	0.41				GI, MUS, LNG, LIV	9 organs			HNF4,Nanog,TAL1,YY1		TNFRSF13B	intronic
chr17:16846298	chr17:16942984	0.6	0.98	rs11078357	T	C	0.67	0.56	0.79	0.41				6 organs	BLD,MUS	POL2		Nkx2		TNFRSF13B	intronic

Figura 24. Resultados obtidos na análise com a ferramenta HaploReg para o SNP rs12938073 (TACI). A) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população europeia. B) Considerando SNPs em desequilíbrio de ligação em população africana. Esta ferramenta mostra para o SNP buscado, assim como para aqueles em desequilíbrio de ligação com este, a posição no cromossomo, os valores de D' e r^2 para o desequilíbrio de ligação, o código rs, os alelos possíveis, as frequências de um destes alelos em diversas populações, se esta posição é conservada em mamíferos (de acordo com algoritmos GERP e SiPhy), se há evidências desta região ter diferentes estados regulatórios de cromatina (em vermelho e laranja), se há evidência da ligação de proteínas na região (em cinza e verde), se há evidência de alteração na expressão gênica associada com diferentes alelos do SNP e se há evidência de alteração do motivo de ligação de proteínas de acordo com o alelo (em rosa). FONTE: HaploReg v3 (WARD e KELLIS, 2012), disponível em http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php, acesso em 26 de junho de 2015.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ANTICORPOS NO SORO

A tabela 21 mostra os resultados da quantificação dos autoanticorpos anti-desmogleína 1 (anti-DSG1) e anti-desmogleína 3 (anti-DSG3) nos subgrupos de pacientes de PFE, de PV e nos indivíduos controle. Como esperado, os indivíduos controles da região de Curitiba foram todos negativos para ambos os anticorpos. Nove indivíduos sem a doença, mas que habitam a área endêmica foram analisados, dos quais um foi positivo para ambos os anticorpos, enquanto os demais foram negativos para anti-DSG1 e, quando testados, também para anti-DSG3. Foi observada uma correlação baixa e negativa entre idade e níveis de anti-DSG1 ($\rho = -0,29$; $P = 0,0042$). A idade foi incluída como variável explicativa no modelo de regressão múltipla.

Os pacientes de PF foram divididos em subgrupos de acordo com a presença ou não de lesões e também de tratamento imunossupressor no momento da coleta. Dos 13 pacientes sem lesão e sem tratamento analisados (PFSLST), 5 foram positivos para anti-DSG1 e um destes foi também positivo para anti-DSG3 (Tabela 21). Já os pacientes com lesão e sem tratamento foram todos (PFCLST, $n = 5$) positivos para anti-DSG1. Apenas um destes foi positivo para anti-DSG3 (Tabela 21). Dos 12 pacientes sem lesão e com tratamento (PFSLCT) analisados, 10 foram positivos para anti-DSG1. Destes 10, 6 foram analisados para anti-DSG3, sendo negativos (Tabela 21). Os outros 2 indivíduos deste subgrupo foram negativos para ambos autoanticorpos. O último subgrupo de PFE incluiu 43 pacientes com lesão e com tratamento (PFCLCT). Destes, apenas 2 foram negativos para anti-DSG1. Todos os indivíduos deste subgrupo testados para anti-DSG3 ($n = 25$) foram negativos (Tabela 21).

Os pacientes de PV ($n = 21$) apresentavam lesões e estavam sob tratamento no momento da coleta. Nove deles foram positivos para anti-DSG1. Destes positivos, 2 foram testados também para a presença de anti-DSG3, sendo que foram positivos. Dos 12 indivíduos deste subgrupo que foram negativos para anti-DSG1, 6 foram testados também para anti-DSG3, sendo que 4 foram negativos e 2 foram positivos (Tabela 21).

Tabela 21. Quantificações dos autoanticorpos no soro de pacientes e de indivíduos controle.

Controles da área endêmica							
ID	Local	Idade	Sexo	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
C630ILB	HAP	74	F	0,38	neg	0,00	neg
C635AAT	HAP	68	M	0,38	neg	0,53	neg
C665HCF	HAP	33	M	4,19	neg	2,64	neg
C688SBA	HAP	43	M	3,52	neg		
C689EGB	HAP	26	M	1,65	neg	0,35	neg
C690AXA	FMRP	51	F	49,37	pos	64,35	pos
C691AXU	HAP	37	F	0,52	neg	0,57	neg
C692LHF	HAP	66	M	1,97	neg	1,21	neg
CP465NGP	HAP	46	M	1,40	neg	1,41	neg
Controles de área não endêmica							
ID	Local	Idade	Sexo	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
C024JCM	UFPR	62	M	0,17	neg	-0,08	neg
C043MLP	UFPR	60	F	0,41	neg	0,00	neg
C068NBP	UFPR	58	F	0,59	neg		
C074KAB	UFPR	44	F	3,35	neg		
C096ALS	UFPR	42	F	12,87	neg	13,25	neg
C099ABB	UFPR	41	F	1,79	neg	0,32	neg
C100VSR	UFPR	56	F	0,30	neg		
C101VKC	UFPR	46	F	0,61	neg		
C134EFR	UFPR	56	F	0,35	neg		
C161TBO	UFPR	46	F	0,57	neg	0,16	neg
C287mrp	UFPR	33	F	1,25	neg	1,13	neg
C288DMF	UFPR	35	F	0,95	neg	0,25	neg
C331LAO	UFPR	32	F	3,32	neg	0,80	neg
C369GAC	UFPR	27	M	1,99	neg	0,09	neg
C384nmp	UFPR	63	M	0,35	neg	0,26	neg
C393ARS	UFPR	55	F	1,30	neg	0,09	neg
C409CFJ	UFPR	29	M	12,69	neg	0,00	neg
C410ERA	UFPR	43	M	0,23	neg	0,35	neg
C423AEV	UFPR	21	F	0,81	neg		
C423AEV	UFPR	20	F	-0,13	neg	0,09	neg
C428lts	UFPR	27	M	2,39	neg	0,16	neg
C430lcp	UFPR	25	F	0,13	neg	-0,09	neg
C434acb	UFPR	36	F	0,63	neg	0,26	neg
C439fsc	UFPR	21	M	0,25	neg	0,35	neg
C444MEK	UFPR	22	F	1,76	neg		
C449LCS	UFPR	21	F	0,23	neg		
C453CMC	UFPR	30	F	1,80	neg	0,79	neg
C464TDF	UFPR	28	F	0,70	neg	0,08	neg
C465JSJ	UFPR	21	F	0,51	neg		
C469MCM	UFPR	20	F	2,96	neg	4,04	neg
C472EKC	UFPR	29	M	1,40	neg	0,44	neg
C473IRR	UFPR	35	F	0,89	neg	2,38	neg
C474RHE	UFPR	34	M	0,00	neg	0,00	neg
C475VLC	UFPR	59	M	2,11	neg		
C476ICM	UFPR	55	F	0,51	neg	0,35	neg
C477OVO	UFPR	55	M	1,06	neg		
C478ZKA	UFPR	62	M	1,73	neg		
C479JOI	UFPR	30	M	12,90	neg		
C480LCO	UFPR	24	F	2,23	neg		
C616SFY	UFPR	27	F	0,71	neg		

continua

Tabela 21. Quantificações dos autoanticorpos no soro de pacientes e de indivíduos controle.

continuação

Pacientes de PF com lesão e sob tratamento								
ID	Local	Idade	Sexo	classe	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
P111JCM	HAP	40	F	2	236,10	pos	1,45	neg
P281FGS	HAP	47	F	2	200,46	pos	3,47	neg
P282NRA	HAP	32	F	2	298,94	pos		
P285JLO	HAP	31	F	2	282,30	pos	0,18	neg
P295EMS	HAP	34	F	2	194,76	pos	1,21	neg
P296ESA	HAP	54	F	2	249,54	pos		
P336ELC	HAP	33	F	2	132,92	pos	0,16	neg
P342GVN	HAP	56	F	1	264,13	pos		
P349CPP	HAP	35	F	2	259,77	pos		
P353JME	HAP	68	M	1	237,06	pos	0,00	neg
P357MAF (2011)	HC	52	M	2	78,00	pos	0,62	neg
P359RSG	HAP	25	F	2	111,57	pos		
P362BCP (mai)	HFSU	54	F	2	179,57	pos	2,64	neg
P363KHP (2012)	HFSU	12	F	2	227,03	pos	0,26	neg
P364INS	HFSU	18	M	2	292,08	pos		
P366SSP	HAP	40	F	2	175,89	pos	2,46	neg
P368AOS	HAP	38	F	2	2,66	neg	1,50	neg
P370SOC	HAP	48	F	1	133,81	pos		
P371ASS	HAP	42	F	2	46,19	pos	0,26	neg
P372DPB	HAP	15	F	2	225,38	pos		
P373ITS	HAP	44	F	2	152,18	pos		
P374JBS	HAP	60	M	2	298,36	pos		
P375ACR	HAP	22	F	2	229,14	pos		
P379FPS	HFSU	25	F	2	260,94	pos	0,18	neg
P380MQJ (fev)	HFSU	16	F	2	165,61	pos	0,26	neg
P381VFS	HFSU	38	M	2	223,21	pos		
P383EYI	HAP	15	F	2	247,41	pos		
P385BXI	HFSU	12	M	2	277,87	pos		
P389DVC	HFSU	17	M	2	194,42	pos	4,36	neg
P390BLW	HFSU	32	F	2	159,11	pos	0,24	neg
P393OKQ	HAP	32	F	2	231,68	pos		
P394XSE	HAP	47	F	2	180,98	pos	2,67	neg
P395KEG	HAP	68	M	2	96,36	pos	1,62	neg
P396NMK	HFSU	31	F	1	239,41	pos	0,40	neg
P397KWV	HFSU	74	M	2	189,57	pos		
P398HKU	HFSU	49	F	2	194,31	pos	1,70	neg
P399LAF	HFSU	33	M	1	256,49	pos	1,62	neg
P407OEV	HAP	32	M	2	181,78	pos	0,73	neg
P408NKP	HFSU	29	M	2	193,74	pos	0,24	neg
P409JGF	HFSU	17	M	2	185,08	pos	0,32	neg
P411WDS	HFSU	32	M	2	240,89	pos	1,62	neg
P412YXZ	HFSU	47	F	2	219,70	pos		
P418KIP	FMRP	33	F	2	0,10	neg		

continua

Tabela 21. Quantificações dos autoanticorpos no soro de pacientes e de indivíduos controle.

continuação

Pacientes de PF com lesão e sem tratamento								
ID	Local	Idade	Sexo	classe	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
P325CEA	HAP	48	M	2	241,05	pos	0,57	neg
P362BCP (nov)	HFSU	54	F	2	180,30	pos	6,62	neg
P391XQG	HFSU	15	F	1	264,35	pos	177,22	pos
P414AIK	FMRP	28	F	2	130,91	pos	0,65	neg
PK253EVM	HAP	62	F	2	240,61	pos	2,99	neg
Pacientes de PF sem lesão e sob tratamento								
ID	Local	Idade	Sexo	classe	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
P229MFF	HAP	52	F	SI	188,50	pos	0,40	neg
P266RMS	HAP	29	F	3	195,56	pos	0,18	neg
P352UDS	HAP	14	M	3	206,80	pos		
P356ADV	HC	37	M	3	173,86	pos	1,67	neg
P357MAF (2014)	HC	55	M	3	4,98	neg	0,26	neg
P363KHP (2014)	HFSU	13	F	SI	230,08	pos	0,26	neg
P367ABP	HAP	22	M	3	209,91	pos		
P369JCC	HAP	30	F	3	241,36	pos	1,23	neg
P382SCD	HAP	17	F	3	241,37	pos	0,18	neg
P384APK	HFSU	52	F	3	0,76	neg	7,48	neg
P392KEB	HAP	38	M	3	91,02	pos		
P419MVI	FMRP	24	F	3	228,36	pos	0,08	neg
Pacientes de PF sem lesão e sem tratamento								
ID	Local	Idade	Sexo	classe	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
P242NRS	HAP	62	F	4	2,81	neg		
P307LRS	HAP	31	F	4	0,93	neg		
P360JIS	HAP	34	M	3	30,46	pos	1,23	neg
P362BCP (fev)	HFSU	53	F	SI	186,42	pos	2,73	neg
P376GOC	HFSU	52	F	3	1,90	neg	0,00	neg
P377IYY	HFSU	48	M	SI	3,40	neg		
P378YHP	HFSU	52	M	4	2,30	neg		
P380MQJ (nov)	HFSU	17	F	3	116,41	pos	0,48	neg
P387YLU	HFSU	30	M	4	96,47	pos	0,40	neg
P388MCY	HFSU	25	M	4	9,50	neg		
P413YNG	FMRP	19	M	3	0,20	neg		
P416OYX	FMRP	35	F	4	4,90	neg	0,32	neg
P417CQY	FMRP	63	M	4	21,87	pos	20,27	pos

continua

Tabela 21. Quantificações dos autoanticorpos no soro de pacientes e de indivíduos controle.

Pacientes de PV com lesão e sob tratamento								conclusão
ID	Local	Idade	Sexo	classe	DSG1 (U/mL)	DSG1_res	DSG3 (U/mL)	DSG3_res
PV004JBA (2011)	HAP	35	F	m	20,71	pos		
PV004JBA (2013)	HAP	37	F	m	5,38	neg		
PV014VLT	HC	58	F	m	2,51	neg	1,37	neg
PV020DSF	HC	42	F	m	1,02	neg		
PV022SCL	HC	64	M	m	46,01	pos	172,21	pos
PV030SMC	HAP	80	F	c	9,85	neg		
PV034MCF	HFSU	80	F	m	2,34	neg		
PV035CGS	HFSU	33	F	mc	149,75	pos		
PV036EAL	HFSU	49	F	mc	3,05	neg		
PV037ASA	HAP	59	F	SI	111,61	pos		
PV038PDK	HAP	62	M	mc	110,66	pos		
PV039WKQ	HFSU	40	F	c	117,16	pos		
PV040EFD	HFSU	29	M	SI	127,92	pos	200,00	pos
PV043EPM	HC	34	M	m	1,90	neg	187,85	pos
PV046VYS	HFSU	48	F	mc	82,77	pos		
PV048CBN	HC	29	M	SI	0,68	neg	13,65	neg
PV049JNI	HC	38	F	m	2,62	neg	4,36	neg
PV056SQL	FMRP	31	F	m	2,73	neg	166,07	pos
PV059VSB	FMRP	45	M	c	2,23	neg	0,24	neg
PV060WQV	FMRP	38	F	c	153,30	pos		
PV061FFA	FMRP	41	F	m	3,86	neg		

ID: identificação do indivíduo; Local: local onde a coleta da amostra foi realizada; classificação: classificação dos pacientes quanto a gravidade das lesões ou tempo sem apresentar novas lesões; DSG1: quantificação de anticorpo anti-desmogleína 1; DSG1_res: interpretação do resultado da quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1; DSG3: quantificação de anticorpo anti-desmogleína 3; DSG3_res: interpretação do resultado da quantificação do anticorpo anti-desmogleína 3; HAP: Hospital Adventista do Pênfigo; FMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; HFSU: Lar da Caridade Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba; HC: Hospital de Clínicas da UFPR; UFPR: Universidade Federal do Paraná; F: feminino; M: Masculino; PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar; 1: paciente com muitas lesões; 2: pacientes com lesões já em cicatrização ou com poucas lesões; 3: pacientes que não apresentam novas lesões há, no máximo, 18 meses; 4: pacientes sem lesões há pelo menos 2 anos; SI: sem informação; m: pacientes apenas com lesões mucosas; mc: paciente com lesões mucocutâneas; c: pacientes apenas com lesões cutâneas; pos: positivo; neg: negativo.

Para três dos pacientes de PV não há informações sobre o tipo de lesão presente no momento da coleta (Tabela 21). Dos 9 que apresentavam apenas lesões na mucosa, 7 foram negativos para anti-DSG1. Dos 4 pacientes com lesões muco-cutâneas, um foi negativo e três foram positivos para anti-DSG1. Dos pacientes com apenas lesões cutâneas, dois foram negativos e dois foram positivos para anti-DSG1.

Conforme descrito no item 4.2, foram feitas comparações da quantidade de anticorpo anti-DSG1 entre subgrupos (Tabela 22, Figura 25). Para esta comparação, o teste de Kruskal-Wallis apresentou um valor de P altamente significativo ($P < 2,2 \times 10^{-16}$). As comparações de subgrupos dois a dois pelo teste de Mann-Whitney (Tabela 23) mostraram que as quantificações para o grupo de indivíduos controle que não habitam áreas endêmicas para PF (Controles) foram significativamente menores das de todos os subgrupos de pacientes, mas não diferiram das do grupo de controles da área endêmica (CE). Os pacientes do subgrupo sem lesão e sem tratamento (PFSLST) tiveram quantidades significativamente menores de anti-DSG1 do que todos os outros subgrupos de pacientes e as quantificações apresentaram um valor de P não significativo, mas muito próximo ao limiar de significância, quando comparadas com as do grupo CE ($P = 0,055$). Além disso, pacientes de PV com lesão e sob tratamento (PV) tiveram quantidades significativamente menores de anti-DSG1 do que o subgrupo de pacientes de PF também com lesão e sob tratamento (PFCLCT).

Tabela 22. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 em controles e subgrupos de pacientes.

	Controle	CE	PFCLCT	PFCLST	PFSLCT	PFSLST	PV
n	39	9	43	5	11	14	21
Média	2,0	7,0	196,4	211,4	167,2	46,5	45,6
Mediana	0,9	1,7	200,5	240,6	206,8	7,2	5,4
Mínimo	-0,1	0,4	0,1	130,9	0,8	0,2	0,7
Máximo	12,9	49,4	298,9	264,4	241,4	186,4	153,3
Desvio padrão	3,3	15,9	72,7	54,7	91,2	67,4	57,7
Variância	10,8	253,8	5280,0	2995,5	8316,7	4544,3	3329,7

Controle: indivíduos controle que não habitam a área endêmica; CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

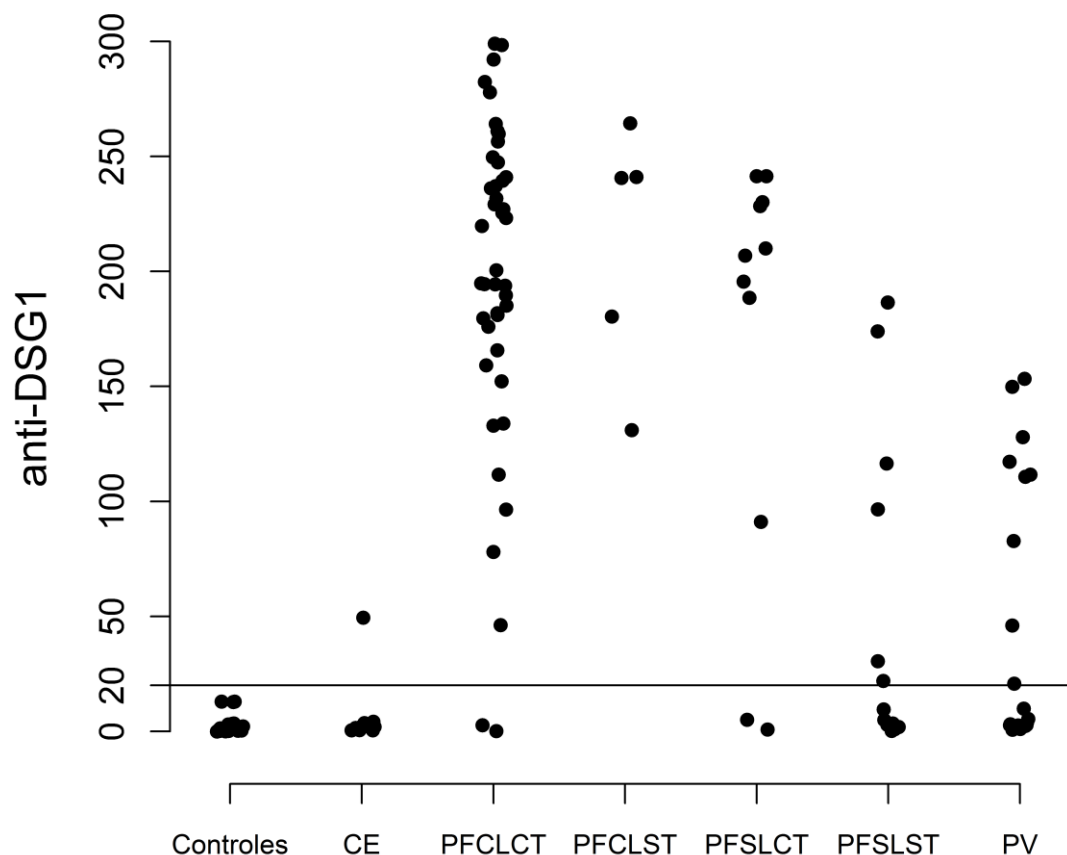


Figura 25. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 em controles e pacientes.

anti-DSG1: quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 (U/mL); Controle: indivíduos controle que não habitam a área endêmica; CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

Tabela 23. Valores de *P* nas comparações de níveis de anticorpo anti-desmogleína 1 entre controles e subgrupos de pacientes pelo teste de Mann-Whitney.

	CE (n = 9)	Controles (n = 39)	PFCLCT (n = 43)	PFCLST (n = 5)	PFSLCT (n = 11)	PFSLST (n = 14)
Controles	0,2193					
PFCLCT	0,00001	1,60 x10⁻¹³				
PFCLST	0,0033	0,0003	0,6855			
PFSLCT	0,0014	0,00001	0,5055	0,4278		
PFSLST	0,0546	0,0002	0,000005	0,0035	0,0041	
PV (n = 21)	0,0145	0,000001	3,40 x 10⁻⁸	0,0011	0,0020	0,9731

Em negrito os valores significativos. Controles: indivíduos controle que não habitam a área endêmica; CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

A análise de regressão múltipla foi feita primeiramente incluindo como variáveis explicativas o sexo, a idade e o subgrupo dos indivíduos. Como a influência do sexo não se mostrou significativa ($P = 0,973$), este foi retirado do modelo. O novo modelo (Tabela 24) mostrou uma influência negativa da idade na quantidade de anti-DSG1, como já havia sido apontado pela análise de correlação. Além disso, utilizando o subgrupo de controles como referência, foi observado um efeito significativo (Tabela 24) dos grupos de pacientes com lesões (PFCLCT e PFCLST), assim como do grupo de pacientes sem lesões sob tratamento imunossupressor (PFSLCT). Uma análise dos resíduos deste modelo de regressão mostrou que o ajuste do modelo estava aceitável (Figura 26).

Uma análise de comparações múltiplas foi feita para a verificação das diferenças entre os subgrupos quanto à quantidades de anti-DSG1 (Figura 27). Os subgrupos PFCLCT, PFCLST e PFSLCT não diferiram entre si, assim como nas comparações pelo teste de Mann-Whitney (Tabela 23). O grupo controle foi semelhante ao grupo de indivíduos controle da área endêmica (CE) e ao grupo de pacientes sem lesões e sem tratamento imunossupressor (PFSLST). Este resultado foi parecido com o obtido na comparação pelo teste de Mann-Whitney, exceto pelo aspecto de que nesta o grupo controle foi significativamente diferente do grupo PFSLST. Nas comparações múltiplas (Figura 27) também foi possível observar uma semelhança entre o grupo de controles da área endêmica (CE) e pacientes de pênfigo vulgar (PV), semelhança que também não havia sido observada nas comparações pelo teste de Mann-Whitney (Tabela 23).

Tabela 24. Resultado da análise de regressão múltipla feita para a quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 utilizando como variáveis explicativas a idade e o subgrupo dos indivíduos.

	Coeficiente	Significância (P)
Idade	-0,7	0,0264
CE	-12,4	0,5511
PFCLCT	180,6	$9,18 \times 10^{-15}$
PFCLST	198,9	$2,3 \times 10^{-9}$
PFSLCT	148,5	$2,41 \times 10^{-8}$
PFSLST	23,2	0,3388
PV	36,5	0,1016

Em negrito os valores significativos. CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

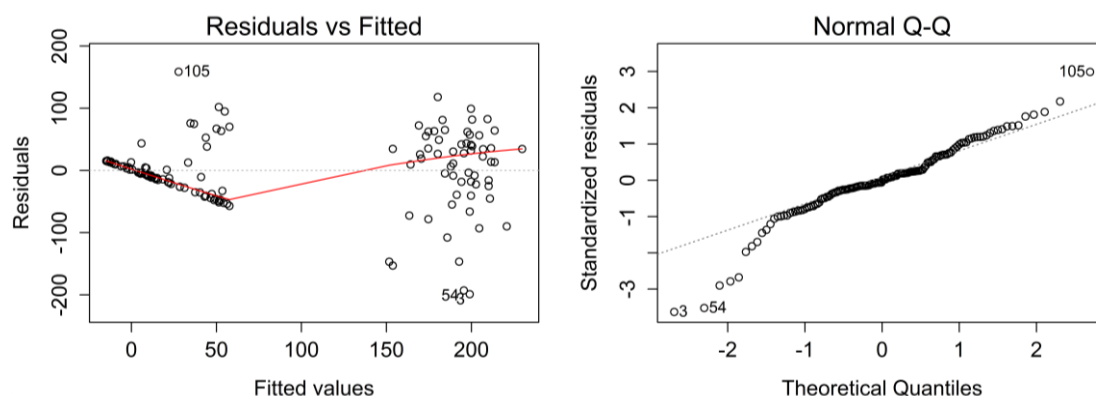


Figura 26. Análise de resíduos do modelo de regressão múltipla feito para a quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 utilizando como variáveis explicativas a idade e o subgrupo dos indivíduos.

O gráfico à esquerda mostra a distribuição dos resíduos, com a linha vermelha próxima ao valor zero. O gráfico da direita mostra o ajuste para a distribuição normal, com os pontos intermediários sobre a diagonal, os pontos iniciais abaixo e os pontos finais acima desta diagonal.

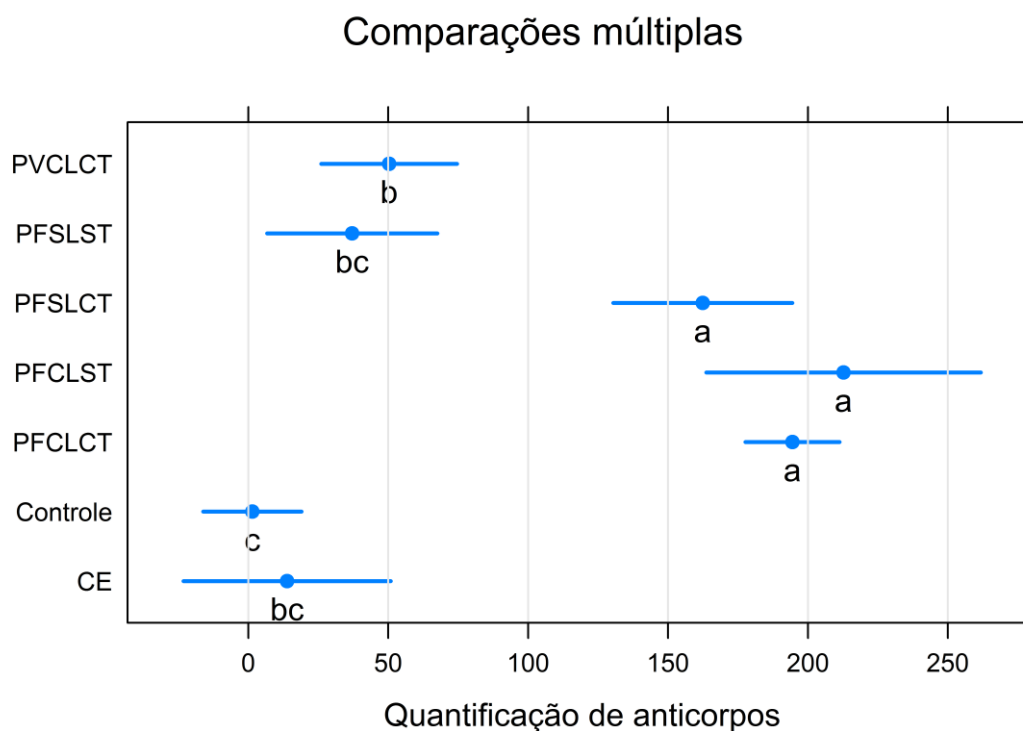


Figura 27. Comparações múltiplas das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 (U/mL) entre os diferentes subgrupos.

Subgrupos para os quais foi atribuída a mesma letra (a, b ou c) podem ser considerado semelhantes. Controle: indivíduos controle que não habitam a área endêmica; CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

Também foram feitas comparações entre pacientes de PF classificados quanto à gravidade das lesões e tempo sem apresentar lesões (Tabela 25, Figura 28). Nesta comparação, o teste de Kruskal-Wallis também foi altamente significativo ($P = 0,0002$). Nas comparações dois a dois (Tabela 26), as quantidades de anti-DSG1 do grupo de pacientes com lesões graves (1) não diferiram das do grupo de pacientes com lesões em cicatrização ou com poucas lesões (2). A diferença observada entre as quantificações deste segundo grupo (2) e do grupo de pacientes sem novas lesões há no máximo 18 meses (3) apresentou um valor de P muito próximo ao limiar de significância ($P = 0,048$). A comparação entre as quantidades de anti-DSG1 do grupo 3 e do grupo de pacientes sem lesões há mais de 2 anos (4) não apresentou diferença significativa, mas teve valor próximo à significância ($P = 0,08$). As demais comparações entre quantidades de anti-DSG1 de pacientes diferiram significativamente (Tabela 26). Quando comparadas as dosagens de anti-DSG1 dos grupos de pacientes sem lesões (3 e 4) com o grupo de controles da área endêmica (CE), os controles tiveram significativamente menos anti-DSG1 que os pacientes sem lesões há no máximo 18 meses (3), mas não houve diferença significativa na comparação com o grupo sem lesões há mais de dois anos.

Tabela 25. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados de acordo com gravidade das lesões ou tempo sem apresentar lesões.

	1	2	3	4
n	6	42	14	7
Média	232,5	193,1	124,5	19,8
Mediana	248,0	194,6	145,1	4,9
Mínimo	133,8	0,1	0,2	0,9
Máximo	264,4	298,9	241,4	96,5
Desvio padrão	49,8	72,3	99,9	34,5
Variância	2479,7	5223,7	9981,8	1193,6

1: pacientes com muitas lesões; 2: pacientes com lesões já em cicatrização ou com poucas lesões; 3: pacientes que não apresentam novas lesões há, no máximo, 18 meses; 4: pacientes sem lesões há pelo menos 2 anos.

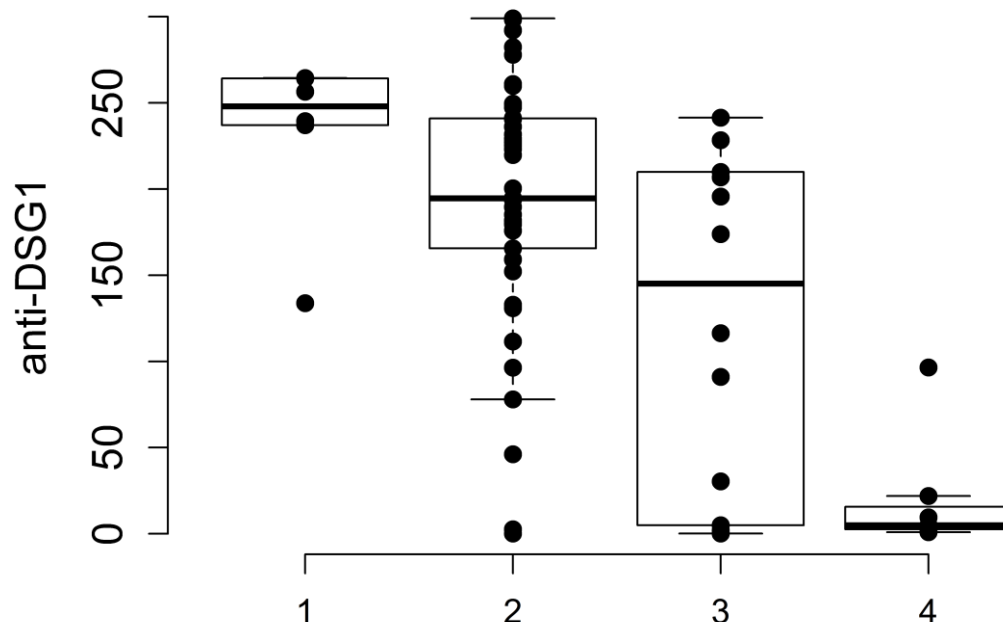


Figura 28. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados de acordo com gravidade das lesões ou tempo sem apresentar lesões.

1: pacientes com muitas lesões; 2: pacientes com lesões já em cicatrização ou com poucas lesões; 3: pacientes que não apresentam novas lesões há, no máximo, 18 meses; 4: pacientes sem lesões há pelo menos 2 anos.

Tabela 26. Valores de P na comparação de níveis de anticorpo anti-desmogleína 1 entre subgrupos de pacientes classificados quanto à gravidade das lesões e tempo sem apresentar novas lesões pelo teste de Mann-Whitney.

	1 (n = 6)	2 (n = 42)	3 (n = 14)	CE (n = 9)
2	0,11542			
3	0,01188	0,048		0,0089
4 (n = 7)	0,00341	0,0002	0,07957	0,0901

Em negrito os valores significativos. 1: pacientes com muitas lesões; 2: pacientes com lesões já em cicatrização ou com poucas lesões; 3: pacientes que não apresentam novas lesões há, no máximo, 18 meses; 4: pacientes sem lesões há pelo menos 2 anos; CE: indivíduos controle que habitam área endêmica para PF.

Foi feita também a comparação das quantidades de anti-DSG3 (Tabela 27, Figura 29) entre os subgrupos de pacientes de PF, pacientes de PV e controles, com diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ($P = 0,0006$). Para anti-DSG3, nas comparações dos subgrupos dois a dois (Tabela 28) o grupo de pacientes de PV teve significativamente mais anti-DSG3 do que praticamente todos os outros grupos, exceto o grupo de pacientes de PF com lesões e sem tratamento, que é o grupo com menor número de indivíduos. Além disso, houve diferença nas quantidades deste anticorpo entre os subgrupos de controles da área endêmica e de controles de fora da área endêmica. As quantidades de anti-DSG3 dos controles de área endêmica não foram significativamente diferentes das de nenhum subgrupo de pacientes de PF, já os controles de fora das áreas endêmicas tiveram menos anti-DSG3 do que pacientes de PF que apresentavam lesões e o valor de P foi muito próximo ao limiar de significância na comparação com pacientes sem lesões e sem tratamento ($P = 0,05$). As quantidades de anti-DSG3 do subgrupo de pacientes de PF com lesões e sem tratamento (PFCLST) apresentaram valores próximos ao limiar de significância nas comparações com as quantidades do subgrupo sem lesões e com tratamento ($P = 0,048$) e do subgrupo com lesões e sob tratamento ($P = 0,066$). As demais comparações não apresentaram diferenças significativas (Tabela 28).

Tabela 27. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 3 em controles e subgrupos de pacientes.

	Controle	CE	PFCLCT	PFCLST	PFSLCT	PFSLST	PV
n	25	8	25	5	8	8	8
Média	1,0	8,9	1,2	37,6	1,3	3,4	93,2
Mediana	0,3	0,9	0,7	3,0	0,3	0,9	89,9
Mínimo	-0,1	0,0	0,0	0,6	0,1	0,0	0,2
Máximo	13,3	64,4	4,4	177,2	7,5	20,3	200,0
Desvio padrão	2,7	22,4	1,2	78,1	2,5	6,9	95,0
Variância	7,3	503,0	1,4	6097,0	6,5	47,3	9030,4

Controle: indivíduos controle que não habitam a área endêmica; CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

Quando a dose de tratamento imunossupressor foi considerada (Tabela 29, Figura 30), não houve diferença significativa nos níveis de anti-DSG1 de pacientes recebendo diferentes doses, nem quando considerados todos os pacientes sob tratamento ($P = 0,5102$), nem quando considerados apenas pacientes de PFE ($P = 0,217$).

Tabela 29. Descrição das quantificações de anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados quanto à dose de tratamento imunossupressor.

	até 10 mg	12-20 mg	25-30 mg	40 mg	50 mg ou maior
n	14	14	6	6	9
Média	188,6	164,3	172,0	236,7	199,9
Mediana	194,0	178,8	235,3	233,9	239,4
Mínimo	91,0	5,0	0,1	209,9	0,8
Máximo	292,1	298,4	298,9	277,9	282,3
Desvio padrão	54,5	81,8	134,3	23,0	87,0
Variância	2975,2	6698,3	18024,0	528,4	7568,2

Controle: indivíduos controle que não habitam a área endêmica; CE: indivíduos controle que habitam áreas endêmicas para PF; PFCLCT: pacientes de PF com lesões e sob tratamento imunossupressor; PFCLST: pacientes de PF com lesões e sem tratamento imunossupressor; PFSLCT: pacientes de PF sem lesões e sob tratamento imunossupressor; PFSLST: pacientes de PF sem lesões e sem tratamento imunossupressor; PV: pacientes de PV, que estavam com lesões e sob tratamento imunossupressor.

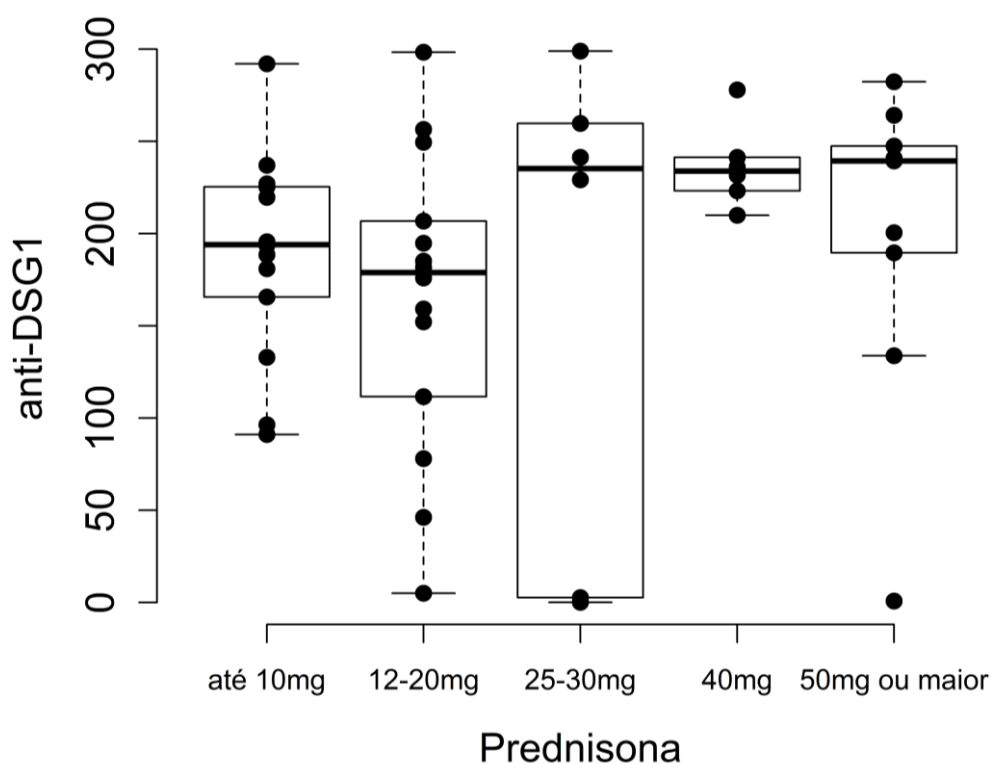


Figura 30. Quantificação do anticorpo anti-desmogleína 1 em pacientes de PF classificados quanto à dose de tratamento imunossupressor.

5.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE mRNA EM PBMC

Foram analisados os níveis de mRNA de *BAFF*, *APRIL*, *TWE-PRIL*, *BAFFR*, *BCMA* e *TACI* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Foram feitas comparações entre o grupo de controles com cada um dos subgrupos de pacientes (Tabela 5), entre os diferentes subgrupos de pacientes de PFE (doença ativa com tratamento: aPFCT; doença ativa sem tratamento: aPFST; doença inativa com tratamento: iPFCT; doença inativa sem tratamento: iPFST), entre os subgrupos de PV (doença ativa: aPV; doença inativa: iPV) e entre pacientes de PF e PV, considerando apenas os subgrupos de doença ativa (aPFCT e aPV) e posteriormente apenas doença inativa (iPFCT e iPV). Também foram agrupados pacientes de PFE considerando apenas a atividade da doença (ativa ou inativa) e o tratamento (presente ou ausente).

Foram observadas diferenças significativas (Figura 31) apenas nas seguintes comparações: *APRIL* entre iPFCT e iPFST, sendo menos expresso em iPFST; *BCMA* entre controles e aPFCT e entre aPFCT e aPFST, sendo que aPFCT apresentou maior expressão em ambos os casos; e *BAFFR* entre controles e aPV, sendo que os pacientes apresentaram expressão reduzida.

Quando os pacientes foram agrupados quanto à atividade da doença (iPF ou aPF) e comparados entre si e com os controles, nenhuma diferença significativa foi observada para nenhum dos 6 genes estudados. Quando os pacientes foram agrupados quanto ao tratamento (sem tratamento ou sob tratamento) e comparados entre si e com os controles, foi observada uma diferença significativa, mas com valor de *P* muito próximo ao limiar de significância para *BCMA*, na comparação entre controles e pacientes sob tratamento ($P = 0,048$).

Também foi feita uma comparação da expressão dos 6 genes dividindo os indivíduos pela presença ou ausência ao anticorpo anti-desmogleína 1 (anti-DSG1). A diferença não foi significativa em nenhuma comparação, utilizando-se todos os indivíduos, nem apenas pacientes. Considerando-se apenas pacientes de PFE (Figura 32), o número de indivíduos negativos foi muito pequeno para a análise estatística.

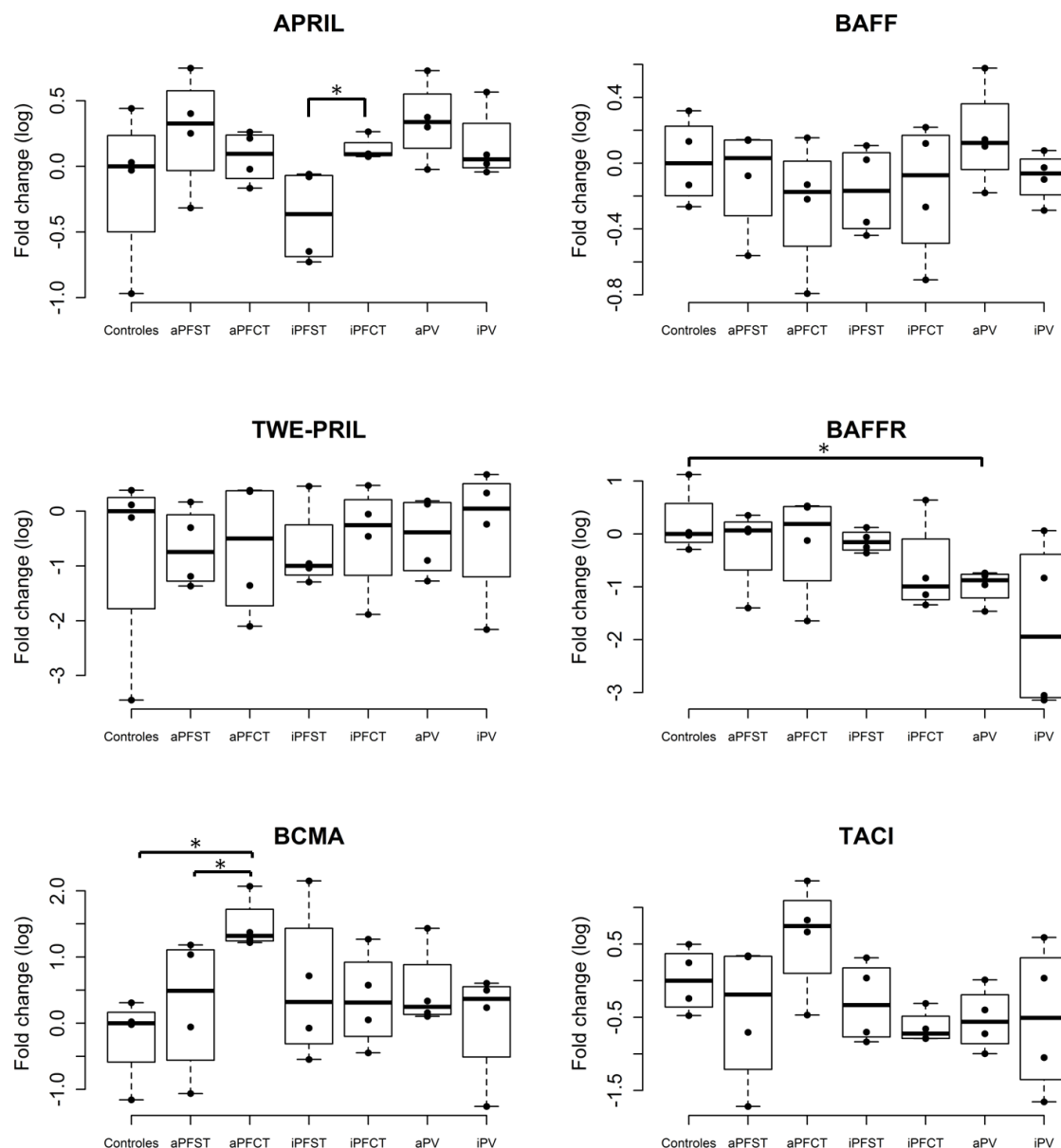


Figura 31. Fold change (em escala logarítmica) da expressão de mRNA em PBMC nos diferentes subgrupos de pacientes e em indivíduos controle.

aPFST: pênfigo foliáceo ativo sem tratamento; aPFCT: pênfigo foliáceo ativo com tratamento; iPFST: pênfigo foliáceo inativo sem tratamento; iPFCT: pênfigo foliáceo inativo com tratamento; aPV: pênfigo vulgar ativo; iPV: pênfigo vulgar inativo; *diferença significativa ($P = 0,02857$).

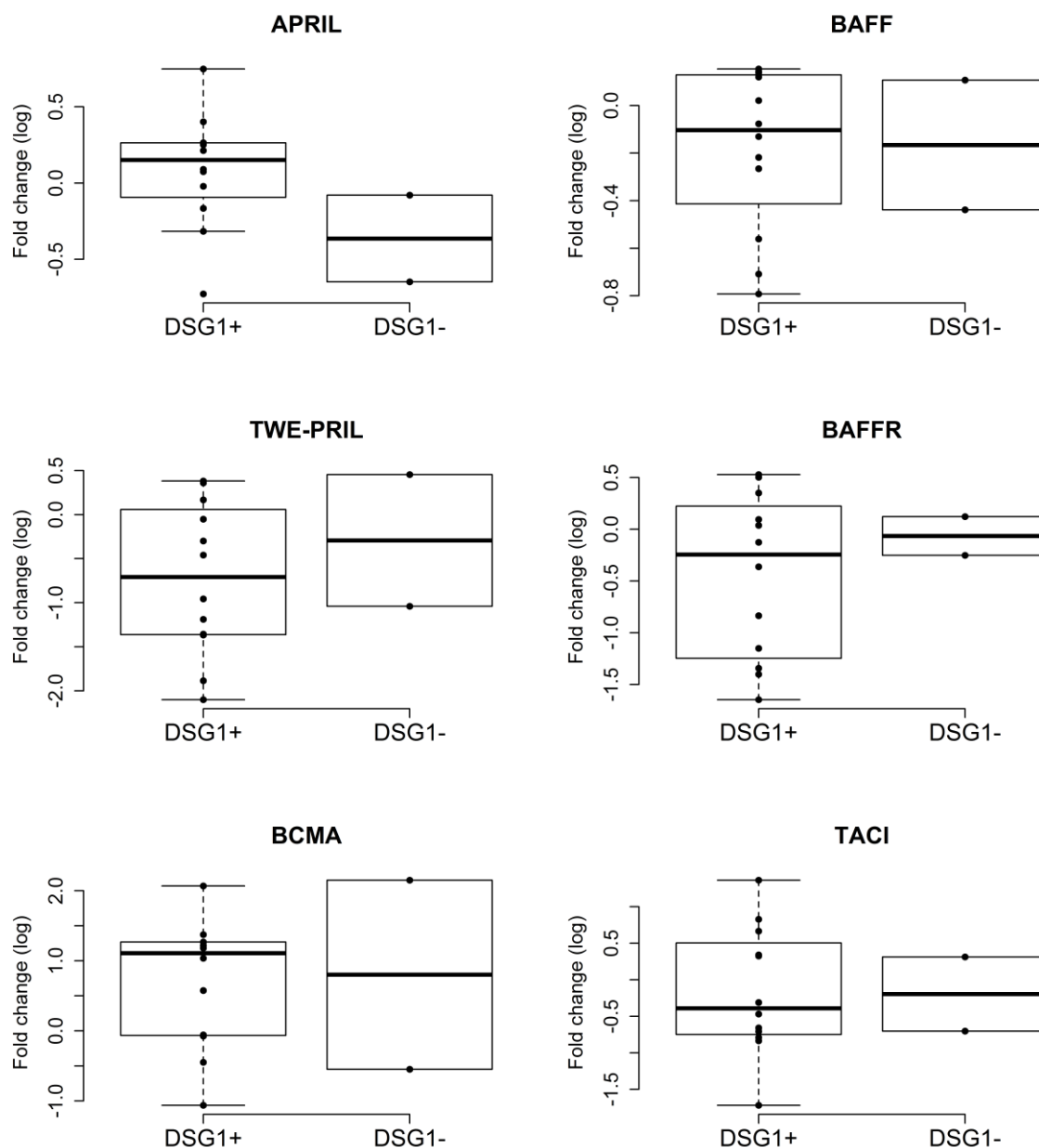


Figura 32. *Fold change* (em escala logarítmica) da expressão de mRNA em PBMC em pacientes de pênfigo foliáceo positivos ou negativos para anti-desmogleína 1. DSG1+: pacientes positivos para anti-desmogleína 1; DSG1-: pacientes negativos para anti-desmogleína 1.

Apesar do pequeno número de indivíduos, as diferenças de expressão observadas parecem não ser consequência dos genótipos nos SNPs para os respectivos genes que foram observados como associados com susceptibilidade diferencial ao PFE (Figura 33). Indivíduos com os mesmos genótipos aparecem com expressão alta e baixa do respectivo gene. A única exceção talvez seja o genótipo AA do rs4421862, gene *BAFF*, no qual os indivíduos parecem ter uma tendência a maior expressão do gene.

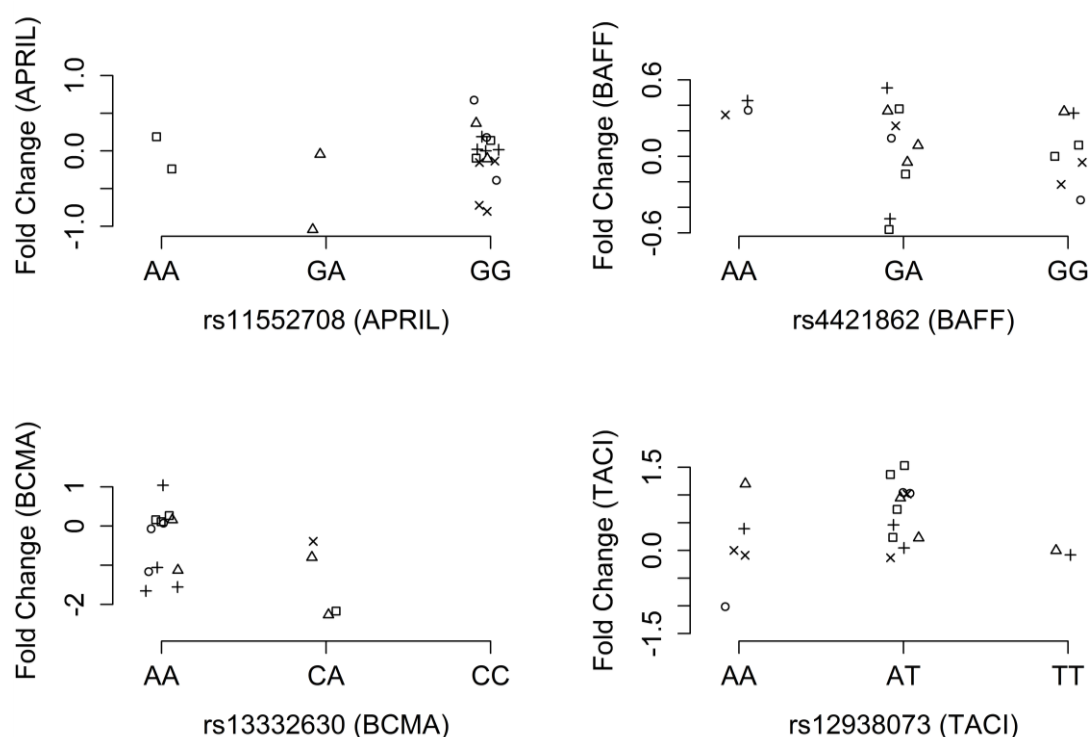


Figura 33. Fold change (em escala logarítmica) da expressão de mRNA em PBMC de acordo com genótipos nos respectivos genes.

○: pênfigo foliáceo ativo sem tratamento (aPFST); □: pênfigo foliáceo ativo com tratamento (aPFCT); x: pênfigo foliáceo inativo sem tratamento (iPFST); +: pênfigo foliáceo inativo com tratamento (iPFCT); Δ: controles. Não foi feita uma comparação estatística.

6. DISCUSSÃO

6.1 ALELOS DE *BAFF*, *APRIL*, *BCMA* E *TACI* ESTÃO ASSOCIADOS COM A SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL AO PFE

Neste trabalho, encontramos associações com susceptibilidade diferencial ao PFE em SNPs de quatro genes: *BAFF*, *APRIL*, *BCMA* e *TACI*. Para o gene *BAFF* nenhum SNP estava associado. Alguns SNPs tiveram associações com valores de *P* muito próximos ao limiar de significância de 5%. Como não foi feita nenhuma correção dos valores de *P*, pode ser que estas associações tenham sido observadas ao acaso. Porém, para quatro SNPs, rs4421862 (*BAFF*), rs11552708 (*APRIL*), rs13332630 (*BCMA*) e rs12938073 (*TACI*), obtivemos valores de *P* próximos a 1%, sendo que estas associações têm maior chance de serem verdadeiras (Figuras 11 a 14). Dois destes SNPs, rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*), mostraram resultados significativos também na análise de regressão logística (Tabela 12), a qual foi feita com um tamanho amostral reduzido, reforçando a chance de serem associações verdadeiras. É possível que se pudessemos utilizar a amostral total nessa análise, mais SNPs apresentassem resultados significativos.

O SNP rs11552708, localizado na região codificadora do gene *APRIL*, está associado também com lupus eritematoso sistêmico (LES) em japoneses (KOYAMA *et al.*, 2003; KAWASAKI *et al.*, 2007) e em americanos de origem hispânica ou africana (LEE *et al.*, 2007) e com doença celíaca em europeus (CASTELLANOS-RUBIO *et al.*, 2012). Porém, não foi encontrada associação com artrite reumatoide em japoneses (KAWASAKI *et al.*, 2007). Neste trabalho (Figura 13) e nas demais associações observadas, o alelo A e/ou o genótipo AA sempre foram menos frequentes em pacientes. A análise feita no presente trabalho com a ferramenta HaploReg (Figura 23) indica que este SNP possa realmente ser o SNP causal, pois está numa região altamente conservada, com muitos marcadores de epigenética e ligação de fatores de transcrição. Além disso, na população africana não há nenhum SNP próximo com r^2 maior que 0,6 e a associação parece mais forte justamente no subgrupo M (Tabela 9), no qual houve alguns valores de *P* próximos ao limiar de significância (apesar de a significância só ter sido obtida consistentemente na amostra total). No trabalho de Lee *et al.* (2007), com

pacientes de LES, a associação foi observada no grupo de afro-americanos, mas não no grupo de euro-americanos.

O SNP (rs11552708) leva a uma alteração de aminoácido na posição 67 do polipeptídeo, com o alelo G codificando para Gly e o alelo A para Arg (KOYAMA *et al.*, 2003). A proteína APRIL é processada no interior da célula por furinas e liberada em forma solúvel (LÓPEZ-FRAGA *et al.*, 2001). O sítio de clivagem está localizado nas posições 104-105, o que significa que o aminoácido 67, alterado pelo SNP, não faz parte da proteína solúvel. Além disso, essa alteração de aminoácido não parece interferir na clivagem, bem como o SNP parece não interferir no processamento alternativo do RNA mensageiro codificado pelo gene (FURUYA *et al.*, 2012). Porém, a variação parece interferir na quantidade de proteína solúvel produzida, com o alelo A levando a redução na quantidade (FURUYA *et al.*, 2012). Um haplótipo contendo o alelo A deste SNP com o alelo G de rs3803800, que tem efeito protetor ao LES, também se mostrou associado com uma redução de APRIL no soro (KAWASAKI *et al.*, 2007). A variação no aminoácido 67 ainda mostrou-se correlacionada com níveis séricos das imunoglobulinas IgM, IgA e IgG (OSMAN *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012). Estes estudos apontam para uma implicação funcional deste SNP, mas o mecanismo pelo qual esta variação produz esses efeitos ainda não é conhecido. Os resultados obtidos no presente estudo na ferramenta HaploReg (Figura 23), comentados no parágrafo anterior, também reforçam a hipótese de uma consequência funcional desta variação.

As evidências parecem mostrar que uma menor quantidade de APRIL, que pode ser causada pelo alelo A do SNP rs11552708, tem efeito protetor em algumas autoimunidades, como LES, doença celíaca e PFE. APRIL estimula células B e células T (YU *et al.*, 2000; STEIN *et al.*, 2002). Pode ser que níveis elevados de APRIL levem a uma maior sobrevivência de células B ou T autorreativas, aumentando a susceptibilidade a doenças autoimunes. APRIL promove a sobrevivência de células plasmáticas (INGOLD *et al.*, 2005; JACOB *et al.*, 2012) e é um fator importante para a produção de anticorpos (YU *et al.*, 2000). APRIL também aumenta as respostas IgG contra antígenos dependentes de células T (CASTIGLI *et al.*, 2004), o que é especialmente interessante no contexto do PF, que é caracterizado por uma resposta imune IgG (ROCK *et al.*, 1989), na qual a participação de células T é importante (SANTI e SOTTO, 2001), o que é evidenciado também pelas associações com genes *HLA* de classe II (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989). Além disso,

proteoglicanas sub-epiteliais criam nichos ricos em APRIL para as células plasmáticas e APRIL prolonga a resposta imune humoral na mucosa (HUARD *et al.*, 2008). No PF, poderia haver um acúmulo de APRIL na pele lesionada, pela ligação com proteoglicanas, ou a ligação direta de APRIL às proteoglicanas das células plasmáticas (INGOLD *et al.*, 2005; SAKURAI *et al.*, 2007), estimulando a produção local de anticorpos ou promovendo a sobrevivência das células plasmáticas. Se isso for verdade, seria esperado um efeito de APRIL também no PV. Níveis aumentados de APRIL foram de fato observados no soro de pacientes de PV (n = 15), porém a diferença com relação aos controles (n = 15) não foi significativa (WATANABE *et al.*, 2007).

Em japoneses, além do rs11552708 (*APRIL*), houve associação do LES também com rs3803800 e rs6608, ambos do gene *APRIL*. O rs3803800 estava em desequilíbrio de ligação com rs11552708 e os haplótipos também encontraram-se associados. Já o SNP rs9907657 não estava associado nem com LES nem com artrite reumatoide (KAWASAKI *et al.*, 2007). No presente trabalho, os SNPs rs3803800 e rs6608 não mostraram associação com PFE, assim como o SNP rs9907657 (Tabela 9).

O banco de dados Ensembl (disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>) mostra o alelo A de rs11552708 (*APRIL*) na sequência do chimpanzé. Este alelo é o mais raro em seres humanos, mas a ocorrência em chimpanzé indica que ele é possivelmente o alelo ancestral. Se for assim, é possível que tenha ocorrido uma pressão de seleção a favor do alelo G, que apresenta maiores quantidades de APRIL solúvel, nos seres humanos. As evidências que indicam que esta variação tem um efeito funcional reforçam a possibilidade de uma pressão de seleção. É possível que uma maior quantidade de APRIL tenha sido vantajosa ao longo da história evolutiva da espécie humana, como possivelmente durante a ocupação de novos ambientes, com exposição a patógenos diferentes.

No presente trabalho também foi encontrada uma associação com o SNP rs13332630 (Figura 12), localizado na região promotora do gene *BCMA*. O receptor *BCMA* liga APRIL com uma afinidade muito maior que BAFF (PATEL *et al.*, 2004) e *BCMA* é essencial na sobrevivência das células plasmáticas (O'CONNOR *et al.*, 2004). A análise com a ferramenta HaploReg (Figura 22) mostrou que a região na qual se encontra este SNP é alvo de marcadores de epigenética e de fatores de transcrição. Porém, outros SNPs em desequilíbrio de ligação poderiam ser os SNPs causais. De qualquer forma, é possível que algum SNP regulador de *BCMA* esteja realmente

influenciando a susceptibilidade ao PFE. Um estudo em japoneses encontrou 12 posições variáveis no gene *BCMA*, sendo que 7 dessas variações eram comuns. Quatro haplótipos foram observados e nenhum deles se mostrou associado com LES nem com artrite reumatoide (KAWASAKI *et al.*, 2001). O único SNP em comum com este estudo foi o rs3743591, que também não está associado ao PFE (Tabela 8). Além disso, um estudo encontrou associação de um microssatélite na região de *BCMA* com doença de Crohn, mas a análise de três SNPs, incluindo o rs3743591, não mostrou nenhuma associação (WAGENLEITER *et al.*, 2005). Não foi localizado na literatura nenhum estudo incluindo o SNP rs13332630. Portanto, este foi o primeiro estudo a mostrar uma associação deste SNP com uma doença. Considerando a associação, já discutida, encontrada com o rs11552708 (*APRIL*), é possível que variações na expressão de ambos *APRIL* e *BCMA* estejam associadas a susceptibilidade diferencial ao PFE. Talvez, as células plasmáticas estimuladas por *APRIL* expressem mais *BCMA*, contribuindo ainda mais para a sinalização de sobrevivência. A análise de interação realizada (Tabela 18) não evidencia um efeito mais forte quando os dois alelos de proteção estão presentes juntos, sendo que o efeito de cada um dos genes parece ser independente do outro.

Outro SNP para o qual foi observada associação com PFE no presente estudo foi o rs12938073 (Figura 14), localizado no intron 3 do gene *TACI*. Esta associação foi estatisticamente significativa também na regressão logística (Tabela 12). Mutações no gene *TACI* são encontradas em 8 a 10% dos pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID), tanto em homozigose quanto em heterozigose, e mesmo familiares de pacientes, heterozigotos para estas mutações, parecem ter alterações em algumas funções das suas células B (MARTINEZ-GALLO *et al.*, 2013). Porém, estudos de associação de variações não codificadoras de *TACI* são escassos. Dois estudos encontraram associação de SNPs em *TACI* com níveis de IgG no soro (LIAO *et al.*, 2012; OSMAN *et al.*, 2012), mas o único SNP em comum com este estudo, rs12603708, apresentou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em nossa amostra de controles (Tabela 10) e, portanto, pode ser que sua tipagem não tenha sido confiável. Além disso, um estudo investigou variações na região codificadora de *TACI* quanto a associações com LES, mas não encontrou nenhuma associação (SALZER *et al.*, 2007). Nesse estudo foi analisado um SNP em comum com o presente estudo, rs34562254, que também não está associado com PFE (Tabela 10). Não foi localizado na literatura nenhum trabalho com o SNP rs12938073, que foi encontrado associado ao PFE no

presente trabalho (Figura 14). Pela análise realizada na ferramenta HaploReg (Figura 24), este SNP localiza-se numa região com regulação por epigenética e pode influenciar a ligação de fatores de transcrição. Porém, outros SNPs próximos em desequilíbrio de ligação com este parecem ter efeitos parecidos, não sendo possível definir qual seria o mais provável SNP causal. De qualquer forma, foi observada uma associação importante com um SNP intrônico do gene *TACI* e a susceptibilidade diferencial ao PFE.

Variações do gene *BAFF*, por outro lado, já foram bastante estudadas em várias doenças, especialmente polimorfismos de região promotora. Em termos de doenças autoimunes, SNPs da região promotora de *BAFF* já foram associados com síndrome de Sjögren primária (NOSSENT *et al.*, 2008), LES (ZAYED *et al.*, 2013), púrpura trombocitopênica idiopática (ABDEL-HAMID e AL-LITHY, 2011) e PFE (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009). Porém, outros estudos com as mesmas doenças e também com artrite reumatoide não encontraram associação (KAWASAKI *et al.*, 2002; GOTTENBERG *et al.*, 2006, 2009; EILERTSEN *et al.*, 2011). O maior interesse pela região promotora provavelmente está relacionado ao fato de níveis de *BAFF* estarem aumentados no soro de pacientes de diversas doenças autoimunes. Além disso, em alguns estudos que procuraram por polimorfismos no gene, os mais comuns eram nesta região (KAWASAKI *et al.*, 2002; GOTTENBERG *et al.*, 2006). Alguns trabalhos encontraram, inclusive, evidências de que o polimorfismo -871C>T (rs9514828), ou haplótipos incluindo este SNP, levavam a alteração na expressão de *BAFF* no soro (GOTTENBERG *et al.*, 2006; EMMERICH *et al.*, 2007; GRAGNANI *et al.*, 2011), em monócitos (KAWASAKI *et al.*, 2002) ou em linhagens de células em ensaios de luciferase (NOVAK *et al.*, 2006; ZHAI *et al.*, 2012), sempre com o alelo T levando a um aumento da expressão.

No presente trabalho, nenhum dos 4 SNPs de região promotora analisados foi encontrado associado ao PFE (Tabela 7). Nem mesmo o rs9514828, referente a posição -871C>T, que havia sido encontrado associado em um estudo anterior (MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009). Em relação a este estudo anterior, a amostra é parcialmente sobreposta, mas o presente trabalho usou uma metodologia diferente para a genotipagem e incluiu 65 controles e 179 pacientes adicionais. Porém, no estudo anterior, foi a amostra de indivíduos clinicamente saudáveis foi mais numerosa para a análise de associação deste SNP. Dos 325 indivíduos genotipados em comum, apenas

10 apresentaram genótipos diferentes com as duas metodologias e esta diferença não foi mais evidente para nenhum genótipo específico. Além disso, quando comparadas as frequências alélicas e genotípicas, os controles dos dois estudos não diferiram entre si ($P = 0,12$ e $P = 0,28$, respectivamente), nem os pacientes ($P = 0,25$ e $P = 0,47$, respectivamente). Por outro lado, em um estudo que avaliou a expressão gênica em células T CD4⁺ de pacientes de PFE (MALHEIROS *et al.*, 2014), BAFF foi visto mais expresso em pacientes com a forma generalizada da doença quando comparados a controles. Se o alelo T do SNP rs9514828 realmente leva a um aumento da expressão do gene, poderia se esperar que este alelo fosse de susceptibilidade ao PFE, porém, o estudo anterior havia encontrado o alelo T como tendo um efeito protetor.

No presente trabalho, este SNP, rs9514828, outro SNP da região promotora, rs9514827, e dois SNPs do intron 2 de *BAFF*, rs7991543 e rs9520829, apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas na amostra de pacientes e sempre por falta de heterozigotos (Tabela 7). Em função disso, foram feitas análises adicionais para esses SNPs, considerando a soma dos homozigotos em relação aos heterozigotos, ou utilizando o três genótipos simultaneamente nas comparações (Tabela 13), porém, elas não ajudaram a elucidar a causa deste desvio. Esses SNPs apresentaram-se em alto desequilíbrio de ligação (D' sempre acima de 0,7 e muitas vezes igual a 1, Tabela 14). É improvável que o desvio observado seja devido a problemas na genotipagem, uma vez que não houve desvio nos controles e as placas de genotipagem foram sempre montadas contendo pacientes e controles concomitantemente. Além disso, se este desvio fosse devido a problemas na genotipagem, não esperaríamos que ocorresse esta coerência entre SNPs em desequilíbrio de ligação, com desvios sempre por menos heterozigotos que o esperado e sempre apenas em pacientes.

No presente trabalho, encontramos uma associação do SNP rs4421862 de *BAFF* no subgrupo M (Figura 11). Este SNP encontra-se no intron 3 do gene, próximo (a cerca de 1200 bases de distância) ao éxon 3, que sofre processamento alternativo, gerando a proteína chamada Δ BAFF, que aparentemente regula negativamente o efeito biológico de BAFF (GAVIN *et al.*, 2003). É possível que este SNP, ou algum outro em desequilíbrio de ligação com este, especialmente no subgrupo M, interfira de alguma forma no processamento alternativo. Uma análise de desequilíbrio de ligação da região deste SNP mostrou que, em populações africanas, apenas um SNP pode ser observado com r^2 em torno de 0,6 e D' de 1, caracterizando um alto desequilíbrio de ligação

(Figuras 16 e 18). Este SNP é o rs73611008, não genotipado no presente estudo, e seu alelo menos frequente possui frequência muito baixa entre europeus (Figura 19), não aparecendo nas análises de desequilíbrio de ligação com populações europeias. É possível, então, que o SNP causal seja, na realidade, o rs73611008. Pelas análises com a ferramenta HaploReg (Figuras 20 e 21), ambos os SNPs ocorrem em sítios de ligação para fatores de transcrição, não sendo os mesmos fatores para cada um dos SNPs. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura a respeito de possíveis associações desses SNPs com doenças, nem com possíveis implicações funcionais.

Uma outra possibilidade que poderia explicar a associação de rs4421862 (*BAFF*) apenas no subgrupo M (Figura 11), seria a ocorrência de algum efeito epistático entre este SNP e algum outro, que fosse polimórfico apenas neste subgrupo. Assim, o efeito de susceptibilidade diferencial ao PFE só apareceria quando o indivíduo tivesse um determinado conjunto de genótipos em dois locos e este conjunto só seria observado no subgrupo M e não no subgrupo EU. Uma análise de mais marcadores do gene *BAFF* assim como em outros genes com possíveis efeitos epistáticos poderia esclarecer esta questão.

Além do SNP rs4421862, outros 3 SNPs de *BAFF*, rs7993590, rs11069727 e rs4145212, apresentaram frequências distintas entre os subgrupos M e EU apenas nos pacientes (Tabela 6). Com exceção do rs4145212, que está localizado mais distante dos demais, os outros 3 SNPs apresentaram alto desequilíbrio de ligação entre si e as frequências haplotípicas não foram muito diferentes entre controles do subgrupo EU e controles do subgrupo M. Porém, entre pacientes EU e M as frequências haplotípicas foram mais diferentes (Tabela 14), indicando que há um efeito dependente dessa região que difere entre grupos étnicos. De qualquer maneira, as associações observadas com os haplótipos parecem ser apenas um reflexo da associação com o rs4421862 (*BAFF*).

Os resultados das análises de interação entre os SNPs encontrados associados com PFE no presente trabalho mostraram que os efeitos de outros SNPs, em especial rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*), aparecem em estratos diferentes de pacientes quanto ao genótipo de rs4421862 (*BAFF*) nos subgrupos EU e M (Tabelas 16 e 17). Esta diferença pode estar evidenciando uma interação, possivelmente um efeito epistático, entre algum SNP de *BAFF*, que esteja em desequilíbrio de ligação com rs4421862 apenas no subgrupo M, e os SNPs de *APRIL* e *TACI* mencionados. Assim, o efeito de susceptibilidade diferencial ao PFE só seria observado quando um certo

conjunto de genótipos nos diferentes *loci* fosse observado. É plausível que ocorram interações entre estes SNPs, pois APRIL e BAFF podem formar heterotrímeros, que inclusive estão aumentados no soro de pacientes com doenças imunes (ROSCHKE *et al.*, 2002; DILLON *et al.*, 2010;) e TACI é um receptor para estas moléculas. O heterotrímero parece ser um indutor menos potente de células B que homotrímeros de BAFF ou de APRIL (DILLON *et al.*, 2010). Uma hipótese que pode ser levantada aqui é que um dos alelos do SNP rs73611008 (*BAFF*) poderia levar a uma diminuição da produção do regulador Δ BAFF, aumentando, assim, o efeito de BAFF e favorecendo a autoimunidade. Em paralelo, a presença do alelo T de rs11552708 (*APRIL*), levaria a uma produção aumentada também de APRIL. Ainda, o alelo A de rs12938073 (*TACI*) poderia também aumentar a expressão de *TACI*, que serviria como receptor tanto para APRIL como para BAFF, elevando ainda mais o risco da autoimunidade. Por outro lado, quando há maior produção de Δ BAFF, há um efeito regulador da função do próprio BAFF, assim como de APRIL, pela possibilidade da formação dos heterotrímeros, protegendo contra a autoimunidade. Outros estudos precisam ser realizados para testar estas hipóteses.

Na análise de regressão logística (Tabela 12), além das associações dos SNPs rs11552708 (*APRIL*) e rs12938073 (*TACI*), foi observada influência da etnia, da escolaridade e do local de residência. A influência da etnia já era esperada e, por isso, a etnia foi considerada nas demais análises de associação. Na descrição da amostra (Tabela 2) é possível observar que a amostra controle tem um nível médio de escolaridade superior em comparação com a amostra de pacientes. Se a escolaridade for um bom marcador de nível socioeconômico e estiver, indiretamente, refletindo a probabilidade de exposição ao fator ambiental, é possível os indivíduos controle não tenham sido tão expostos a esse fator ambiental quanto os pacientes. Isto poderia significar que alguns controles possam ser portadores de alelos de susceptibilidade, mas não ter desenvolvido a doença pela falta da exposição ao fator ambiental. Assim, é possível que algumas associações não tenham sido detectadas. Porém, esta diferença não deve levar a ocorrência de associações espúrias, não colocando em dúvida as associações aqui encontradas. É interessante observar que a ocupação, classificada como rural ou não, não mostrou influência significativa (Tabela 12), indicando um bom pareamento das amostras quanto a este critério. Quanto a região de residência, a diferença se deve ao fato de a maioria dos indivíduos controle terem sido contatados por

intermédio do Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande. Nas coletas realizadas em outros hospitais, que iniciaram mais recentemente, ainda não foi possível um esforço equivalente para a obtenção de amostras de indivíduos controle. Porém, como os hospitais se localizam em regiões endêmicas, esta diferença na região de residência não deve estar influenciando os resultados de associação.

6.2 NÍVEIS DE mRNA DE *BAFF*, *APRIL* E SEUS RECEPTORES EM PBMC DE PACIENTES DE PÊNFIGO E CONTROLES

Na análise da quantificação do mRNA em PBMC, apenas algumas comparações entre subgrupos de pacientes e controles mostraram diferenças significativas. Os valores de *P* foram de 0,03, próximos ao limiar de significância de 0,05. Se considerarmos as múltiplas comparações feitas, não podemos excluir a possibilidade das diferenças significativas terem sido observadas ao acaso. De qualquer forma, na observação do *boxplot* gerado (Figura 31), as comparações que diferiram significativamente se destacam, geralmente incluindo pelo menos um grupo com menor variabilidade interindividual.

Caso as diferenças sejam mesmo reais, podemos dizer que há um aumento da expressão de *BCMA* em pacientes de PFE ativo sob tratamento imunossupressor, tanto em relação aos controles, quanto em relação aos pacientes com doença ativa e sem tratamento (Figura 31). Este aumento poderia ser uma consequência do estado de doença ativa, que é mais grave nos pacientes deste subgrupo. A diferença poderia refletir um maior número de células B ativadas e especialmente de células plasmáticas circulantes nesse subgrupo de pacientes. Ou ainda, a diferença poderia refletir um aumento da expressão de *BCMA* por células B e/ou T. Em púrpura trombocitopênica idiopática (GU *et al.*, 2009) e artrite reumatoide (MOURA *et al.*, 2013), o nível de mRNA de *BCMA* em PBMC de pacientes foi igual ao de controles. Já em LES, foi observado um aumento de *BCMA* na membrana de células B de pacientes, especialmente células B de memória e plasmablastos (KIM *et al.*, 2011).

Também foi observada no presente trabalho uma diminuição da expressão de *BAFFR* em pacientes de PV com doença ativa em relação ao grupo controle (Figura 31). Esta diminuição pode ser consequência da doença, mas também pode ser consequência do tratamento imunossupressor. Há uma tendência, não significativa, para a diminuição

da expressão também nos grupos de PFE inativo e PV inativo, ambos os grupos também sob tratamento imunossupressor. Se for uma consequência da doença, é possível que ocorra uma redução de células B circulantes devido ao sequestro para os locais de lesão e linfonodos. Em síndrome de Sjögren e em LES, foi vista uma menor expressão de BAFFR nos pacientes em relação aos controles, porém a diferença não foi observada quando analisado o mRNA. Além disso, os níveis de BAFF do soro foram inversamente proporcionais aos níveis de BAFFR na membrana das células (SELLAM *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2010). É possível que os níveis de BAFF no soro levem a uma regulação, talvez pós-transcricional, dos níveis de BAFFR. Já na doença de Behçet, foi observado simultaneamente um aumento nos níveis de BAFF no soro e um aumento de BAFFR na membrana das células B (HAMZAOU *et al.*, 2008). Em púrpura trombocitopênica idiopática, foi observado um aumento de mRNA de *BAFF*, mas não de *BAFFR*, em PBMC (ZHOU *et al.*, 2009). Em artrite reumatoide, foi visto um aumento de mRNA de *BAFFR* em PBMC de acordo com a progressão da doença (MOURA *et al.*, 2013). Isto mostra que o perfil de expressão destas moléculas coestimuladoras deve variar de acordo com a doença e mais estudos são necessários para entender seu comportamento no PFE.

A última diferença observada foi uma diminuição da expressão de *APRIL* em pacientes de PFE inativo sem tratamento em relação ao grupo de PFE inativo com tratamento (Figura 31). É possível que esta redução na expressão represente o efeito da remissão da doença. O grupo de pacientes com a doença inativa e sem tratamento é parecido com o grupo controle, porém com uma menor amplitude dos valores. Já o grupo com doença inativa e sob tratamento é parecido com grupo com doença ativa e sob tratamento. Este grupo com a doença inativa, mas ainda sob tratamento, pode ter um quadro imunológico de doença ativa, apesar de não apresentar novas lesões. Nas análises de presença de autoanticorpos, que serão discutidas no tópico 6.3, foi visto que pacientes que não apresentam novas lesões há pouco tempo são muito heterogêneos quanto à presença de autoanticorpos (Figura 28), contribuindo para esta noção de que o quadro imunológico ainda não foi completamente normalizado.

Alguns trabalhos que quantificaram as proteínas *APRIL* e *BAFF* no soro de pacientes, também quantificaram o mRNA em PBMC. Porém, nem sempre houve uma correlação dos níveis deste mRNA com os níveis das proteínas no soro (STOHL *et al.*, 2003, 2004; KNIGHT *et al.*, 2007; LA *et al.*, 2008; EILERTSEN *et al.*, 2011) e níveis

de mRNA de *BAFF* e *APRIL* variam mais ao longo da vida de indivíduos saudáveis do que os níveis de proteína no soro (STOHL *et al.*, 2003; 2004). Portanto, os níveis de mRNA, especialmente considerando PBMC, não necessariamente refletem a quantidade de proteína realmente disponível no indivíduo. No caso de *BAFF*, para pacientes de LES, foi observado que os níveis de mRNA no sangue periférico estão melhor correlacionados com a atividade da doença do que os níveis da proteína no soro (ZOLLARS *et al.*, 2015). No presente trabalho, pretendíamos também analisar os níveis de *BAFF* e *APRIL* no soro dos pacientes, porém, os resultados obtidos não foram confiáveis e tiveram que ser descartados.

Quando agrupamos os pacientes apenas pela presença de lesões, desconsiderando o tratamento, não vimos nenhuma diferença significativa quanto à expressão de nenhum dos 6 genes testados. A ausência de diferenças significativas pode ser devida a variação na gravidade das lesões dos pacientes, que se reflete numa variação da expressão dos genes, não permitindo a visualização do efeito da doença ativa. Ainda, devemos considerar que os pacientes sem lesões com e sem tratamento também diferem bastante quanto ao seu perfil de resposta imunológica, como discutido acima.

Quando agrupamos os pacientes de acordo com a presença do tratamento, desconsiderando as lesões, a única diferença significativa foi para o gene *BCMA*, para o qual os pacientes sob tratamento apresentaram expressão aumentada em relação aos controles, com um valor de *P* de 0,048. Se esta diferença for real, ela pode ser reflexo da diferença observada para o grupo de doença ativa com tratamento, discutida acima, e ser devida às graves lesões observadas neste grupo.

Já foi relatado na literatura que o tratamento com prednisona (tratamento imunossupressor mais comum para PF no Brasil) leva a uma redução dos níveis séricos de *BAFF* (STOHL *et al.*, 2003), mas nenhum estudo que avaliasse os níveis de mRNA foi localizado. Outros tratamentos, como dexametasona (ZHU *et al.*, 2009) e hidroxicloroquina (MUMCU *et al.*, 2013), também levaram a uma redução da expressão de *BAFF*. Porém, o ideal para se avaliar o efeito do tratamento na expressão dos genes seria acompanhar pacientes antes, durante e após esse tratamento, pois a variação interindividual atrapalha na visualização do efeito, especialmente em amostras pequenas, como foi o caso do presente estudo.

Apesar do pequeno número amostral, foi analisada a variação da expressão dos genes de acordo com os genótipos dos SNPs encontrados associados com PFE neste trabalho (Figura 33). O único gene que mostrou uma certa tendência foi o gene *BAFF*, com o genótipo AA do SNP rs4421862 apresentando uma expressão mais elevada (não foi feita uma análise estatística, devido ao pequeno tamanho amostral). Porém, este SNP mostrou associação apenas no subgrupo M e os indivíduos AA utilizados nesta análise são todos do subgrupo EU, indicando que a expressão elevada em relação aos outros genótipos pode ter sido observada ao acaso. Além disso, a variação em *fold change* para este gene foi menor que para os outros (Figura 33), sendo que a diferença não é muito ampla. Na literatura, só há estudos que tentaram correlacionar SNPs da região promotora de *BAFF* com a expressão, sendo que o alelo T do SNP rs9514828 parece levar a uma maior expressão, como discutido no tópico 6.1. É possível que estudos com amostras maiores revelem diferenças de expressão entre genótipos dos SNPs associados com PFE no presente estudo, pois todos eles encontram-se em regiões reguladoras dos genes.

6.3 NÍVEIS DE AUTOANTICORPOS NO SORO DE PACIENTES DE PÊNFIGO E DE CONTROLES

Como esperado, o autoanticorpo anti-DSG3 é muito mais prevalente (Tabela 21) nos pacientes de PV (50%) do que de PFE (4%). Já o autoanticorpo anti-DSG1 (Tabela 21) é mais comum em pacientes de PF (84%) do que de PV (43%). De qualquer forma, tivemos pacientes para as duas doenças que foram positivos para ambos os autoanticorpos. Outros estudos dos níveis destes autoanticorpos em PFE avaliaram principalmente indivíduos da área indígena Limão Verde (WARREN *et al.*, 2000 e HILARIO-VARGAS *et al.*, 2006), onde é encontrada a mais alta prevalência de PFE (3,4%).

Os níveis de anti-DSG1 foram significativamente diferentes entre controles e pacientes, tanto de PF quanto de PV (Figura 25, Tabela 23). Entre os subgrupos de pacientes de PF, o único que diferiu dos demais foi o subgrupo de pacientes sem lesões e sem tratamento imunossupressor no momento da coleta. É interessante destacar que este subgrupo não foi diferente do grupo de controles da área endêmica (CE), nem na comparação pelo teste de Mann-Whitney e nem nas comparações múltiplas (Tabela 23,

Figura 27). Quando foi utilizada a classificação dos pacientes quanto ao tempo sem apresentar lesões, o grupo de controles endêmicos não diferiu do grupo de pacientes que estão há mais de dois anos sem novas lesões (Tabela 25, Figura 28). É possível que o perfil de anticorpos dos pacientes em remissão seja realmente igual ao de indivíduos sem a doença, mas que habitam regiões endêmicas. Não haviam pacientes de PV em remissão, mas os níveis de anti-DSG3 dos controles endêmicos foram semelhantes aos níveis dos pacientes de PF (Tabela 27, Figura 29).

No presente trabalho, dos 25 pacientes de PFE em remissão, 15 (60%) foram positivos para anti-DSG1. Considerando apenas os indivíduos já sem tratamento imunossupressor, 5 de 13 (38%) foram positivos. No grupo há mais de 2 anos sem lesões, 2 de 7 (29%) pacientes foram positivos (Tabela 21). Pacientes em remissão ainda apresentando autoanticorpos já foram observados (AOKI *et al.*, 2004b; KWON *et al.*, 2008; DHANDHA *et al.*, 2012; NAKAHARA *et al.*, 2014 e WEISS *et al.*, 2015), mas o tempo sem lesões nem sempre é relatado. No Japão, 33% (4/12) dos pacientes de PF sem lesões há pelo menos 3 meses e sob um máximo de 15mg/dia de tratamento imunossupressor foram positivos pra anti-DSG1 (KWON *et al.*, 2008), se considerados os pacientes sob até 5mg/dia de tratamento, a porcentagem cai para 17% (1/6). De qualquer forma, uma porcentagem considerável dos pacientes permanece positiva mesmo em remissão. No presente trabalho, o grupo de PFE sem lesões há um curto período de tempo, incluindo muitos ainda sob tratamento, foi o grupo com a maior amplitude nos níveis de anti-DSG1 (Tabela 25, Figura 28), refletindo a dificuldade que existe em determinar a ocorrência de doença ativa nos indivíduos que já não desenvolvem novas lesões, mas que ainda estão em risco de recaída. Dentre os subgrupos classificados de acordo com a presença ou não de lesões e tratamento, a maior amplitude foi observada no subgrupo sem lesões mas sob tratamento imunossupressor (PFSLCT), subgrupo que não diferiu nas quantidades de anti-DSG1 em relação aos subgrupos de pacientes com lesões (Tabela 23, Figura 25). Em conjunto, estes dados mostram a importância de relatar o tempo sem lesões e sem tratamento quando pacientes em remissão forem considerados.

Os controles endêmicos apresentaram níveis semelhantes de anti-DSG3 aos de pacientes de PFE (Tabela 28, Figura 29) e níveis semelhantes de anti-DSG1 aos de pacientes de PFE em remissão (Tabelas 23, 24 e 26, Figuras 25, 27 e 28). Na área indígena de Limão Verde, 55% (51/93) dos indivíduos sem pênfigo foram positivos

para anti-DSG1 (WARREN *et al.*, 2000) e 36% (53/146) foram positivos para anti-DSG3 (HILARIO-VARGAS *et al.*, 2006). Considerando regiões no entorno de Limão Verde, as porcentagens caem para 19% (54/279) de anti-DSG1 e 6% (8/140) de anti-DSG3 positivos. No presente trabalho, apenas um dos 9 (11%) indivíduos controle da área endêmica foi positivo para ambos anticorpos (Tabela 21). Este indivíduo era da região de São Paulo, onde Warren *et al.* (2000) observaram 21% dos indivíduos controle como sendo positivos pra anti-DSG1, mas também onde nenhum dos 18 indivíduos analisados por HILARIO-VARGAS *et al.* (2006) foi positivo para anti-DSG3. Além disso, anticorpos anti-DSG também foram observados em indivíduos sem pênfigo de uma área endêmica no Peru (ORTEGA-LOAYZA *et al.*, 2006) e em doadores de sangue de áreas não-endêmicas (PRÜßMANN *et al.*, 2014). Estes dados indicam que autoanticorpos anti-DSG devem ser usados com cautela no diagnóstico de pênfigo, especialmente em áreas onde a doença é endêmica.

No presente estudo, 20 pacientes de PV foram testados quanto a presença de anticorpo anti-DSG1 (Tabela 21). Para três deles não há informações precisas sobre o tipo de lesão presente no momento da coleta. Para os demais, houve uma clara tendência a maiores níveis de anti-DSG1 em pacientes com lesões cutâneas, como era esperado (DING *et al.*, 1997). Dos 9 pacientes que apresentavam apenas lesões na mucosa, 7 foram negativos para anti-DSG1. Os dois que foram positivos apresentaram valores baixos (abaixo de 50 U/mL). Dos 4 pacientes com lesões muco-cutâneas, um foi negativo e três foram positivos, com valores altos (acima de 80 U/mL), para anti-DSG1. Dos pacientes com apenas lesões cutâneas, dois foram negativos e dois foram positivos, com valores altos (acima de 110 U/mL), para anti-DSG1. Os dois indivíduos negativos tinham menos lesões e estavam sob níveis mais baixos de tratamento imunossupressor. Apesar da clara tendência de ocorrência de níveis mais altos de anti-DSG1 em pacientes de PV com lesões cutâneas, foram observados indivíduos positivos e com lesões apenas nas mucosas, assim como indivíduos com lesões cutâneas e resultado negativo (Tabela 21). Já foram observados pacientes com lesões nas mucosas e que apresentavam apenas anticorpos anti-DSG1 (KOGA *et al.*, 2012).

A ocorrência de anticorpos anti-DSG3 em pacientes de PFE já é conhecida (ARTEAGA *et al.*, 2002). No presente trabalho, dois pacientes de PFE foram positivos para anti-DSG3 (Tabela 21). Nestes dois pacientes, houve concordância entre os níveis dos dois autoanticorpos, sendo que em um paciente ambos anticorpos tinham níveis

altos (acima de 170 U/mL), enquanto no outro ambos tinham níveis baixos, próximos ao limite de positividade de 20 U/mL. Este segundo paciente se apresentava em remissão no momento da coleta, há cerca de 10 anos sem apresentar novas lesões e sem utilizar tratamento imunossupressor. A presença de anti-DSG3 em pacientes de PF e inclusive em indivíduos controle, especialmente em área endêmica, faz com que este anticorpo não seja indicado para o diagnóstico diferencial entre pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.

7. CONCLUSÕES

Foram observadas associações de SNPs de *BAFF*, *APRIL*, *BCMA* e *TACI* com susceptibilidade diferencial ao PFE. Nenhum SNP de *BAFFR* encontrou-se associado. O SNP rs11552708, do gene *APRIL*, já havia sido associado com outras doenças autoimunes e parece influenciar na expressão de *APRIL*, sendo provavelmente o SNP causal da associação. Para os demais SNPs, rs13332630 (*BCMA*), rs12938073 (*TACI*) e rs4421862 (*BAFF*), esta foi a primeira associação descrita com uma doença.

A associação observada com o SNP rs4421862 (*BAFF*) ocorreu apenas no subgrupo com origem étnica mestiça, africana e europeia, e não no subgrupo de eurodescendentes. Esta associação pode ter ocorrido por desequilíbrio de ligação com o SNP rs73611008 (*BAFF*), que em populações de origem europeia tem um dos alelos com frequência muito baixa.

Nas quantificações de mRNA dos genes estudados em PBMC, foi observada uma maior quantidade de *APRIL* em pacientes de PFE com a doença inativa sob tratamento imunossupressor em relação aos pacientes também com doença inativa e sem tratamento imunossupressor. Foi observada maior quantidade de *BCMA* em pacientes de PFE com doença ativa e sob tratamento imunossupressor em relação aos pacientes também com doença ativa, mas sem tratamento imunossupressor, e também em relação aos indivíduos sem a doença (controles). Os indivíduos controle apresentaram mais *BAFFR* do que pacientes de pênfigo vulgar com a doença ativa.

A grande maioria (46 de 48) dos pacientes de PFE com a doença ativa foram positivos para o autoanticorpo anti-desmogleína 1. Porém, muitos pacientes em remissão (15 de 25) assim como um indivíduo controle da área endêmica também apresentaram este anticorpo. Pacientes que há pouco tempo não apresentam lesões, alguns ainda sob tratamento imunossupressor, são muito heterogêneos quanto aos níveis de autoanticorpos e o tempo sem lesões e sem tratamento deve ser considerado quando pacientes em remissão forem considerados. Os resultados do presente estudo evidenciam a baixa especificidade e sensibilidade dos níveis de anticorpos anti-desmogleína no diagnóstico diferencial de pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.

Foram encontradas fortes evidências de que variações genéticas dos coestimuladores de linfócitos, *BAFF* e *APRIL*, assim como de seus receptores, desempenham um papel importante na susceptibilidade ao PFE. Estudos funcionais dos SNPs associados, assim como estudos destes SNPs em amostras independentes serão importantes para a confirmação dos resultados aqui encontrados.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, S. M.; AL-LITHY, H. N. B cell activating factor gene polymorphisms in patients with risk of idiopathic thrombocytopenic purpura. **The American journal of the medical sciences**, v. 342, n. 1, p. 9–14, 2011.

AMAGAI, M. *et al.* Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. **The Journal of investigative dermatology**, v. 104, n. 6, p. 895–901, 1995.

AMAGAI, M. *et al.* Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. **The Journal of investigative dermatology**, v. 106, n. 2, p. 351–5, 1996.

AOKI, V. *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**, v. 9, n. 1, p. 34–40, 2004.

ARTEAGA, L. A. *et al.* A subset of pemphigus foliaceus patients exhibits pathogenic autoantibodies against both desmoglein-1 and desmoglein-3. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 5, p. 806–811, 2002.

ASASHIMA, N. *et al.* Serum levels of BAFF are increased in bullous pemphigoid but not in pemphigus vulgaris. **The British journal of dermatology**, v. 155, n. 2, p. 330–6, 2006.

AUGUSTO, D. G. *et al.* Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39991, 2012.

BASTUJI-GARIN, S. *et al.* Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **The Journal of investigative dermatology**, v. 104, n. 2, p. 302–5, 1995.

BOSSEN, C.; SCHNEIDER, P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. **Seminars in immunology**, v. 18, n. 5, p. 263–75, 2006.

BRAUN-PRADO, K. *et al.* HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue antigens**, v. 56, n. 5, p. 417–27, 2000.

BRAUN-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and molecular biology**, v. 30, n. 2, p. 314–321, 2007.

BROWNING, J. L. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 7, p. 564–76, 2006.

CASTELLANOS-RUBIO, A. *et al.* Angiogenesis-related gene expression analysis in celiac disease. **Autoimmunity**, v. 45, n. 3, p. 264–70, 2012.

CASTIGLI, E. *et al.* Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3903–8, 2004.

CHEEMA, G. S. *et al.* Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1313–9, 2001.

CHHABRA, M. *et al.* BAFF and associated TNF superfamily members in renal transplantation: an end to BLySful ignorance. **Transplantation**, v. 96, n. 10, p. 853–9, 2013.

DALLA-COSTA, R. *et al.* Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human immunology**, v. 71, n. 8, p. 809–17, 2010.

DARIDON, C.; YOUINOU, P.; PERS, J.-O. BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who? **Autoimmunity reviews**, v. 7, n. 4, p. 267–71, 2008.

DE ALMEIDA, E. R. A.; PETZL-ERLER, M. L. Expression of genes involved in susceptibility to multifactorial autoimmune diseases: estimating genotype effects. **International journal of immunogenetics**, 2012.

DHANDHA, M. M.; SEIFFERT-SINHA, K.; SINHA, A. A. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. **Autoimmunity**, v. 45, n. 7, p. 516–26, 2012.

DIAZ, L. A. *et al.* Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **The Journal of investigative dermatology**, v. 92, n. 1, p. 4–12, 1989.

DILLON, S. R. *et al.* B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 2, p. R48, 2010.

DING, X. *et al.* Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. **The Journal of investigative dermatology**, v. 109, n. 4, p. 592–596, 1997.

EATON, D. P. *et al.* Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 2, p. 120–31, 1998.

EILERTSEN, G. *et al.* Increased levels of BAFF in patients with systemic lupus erythematosus are associated with acute-phase reactants, independent of BAFF genetics: A case-control study. **Rheumatology**, v. 50, n. 12, p. 2197–2205, 2011.

EMMERICH, F. *et al.* High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. **British journal of haematology**, v. 136, n. 2, p. 309–14, 2007.

EVANGELISTA, F. *et al.* E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 7, p. 1710–1718, 2008.

EYRE, R. W.; STANLEY, J. R. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. **The Journal of clinical investigation**, v. 81, n. 3, p. 807–12, 1988.

FLORES, G.; QIAN, Y.; DÍAZ, L. A. The enigmatic autoimmune response in endemic pemphigus foliaceus. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 100 Suppl , p. 40–8, 2009.

FURUYA, T. *et al.* Effects of APRIL (TNFSF13) polymorphisms and splicing isoforms on the secretion of soluble APRIL. **Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association**, v. 22, n. 4, p. 541–9, 2012.

GABRIEL, S.; ZIAUGRA, L.; TABBAA, D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. **Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]**, v. Chapter 2, p. Unit 2.12, 2009.

GAVIN, A. L. *et al.* DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38220–8, 2003.

GONÇALVES, G. A. P. *et al.* Incidence of pemphigus vulgaris exceeds that of pemphigus foliaceus in a region where pemphigus foliaceus is endemic: analysis of a 21-year historical series. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1109–12, 2011.

GOTTENBERG, J.-E. *et al.* No evidence for an association between the -871 T/C promoter polymorphism in the B-cell-activating factor gene and primary Sjögren's syndrome. **Arthritis research & therapy**, v. 8, n. 1, p. R30, 2006.

GOTTENBERG, J.-E. *et al.* Markers of B-lymphocyte activation are elevated in patients with early rheumatoid arthritis and correlated with disease activity in the ESPOIR cohort. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 4, p. R114, 2009.

GRAGNANI, L. *et al.* Genetic determinants in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia: role of polymorphic variants of BAFF promoter and Fcγ receptors. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 5, p. 1446–51, 2011.

GROOM, J. *et al.* Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 1, p. 59–68, 2002.

GROSS, J. A *et al.* TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. **Immunity**, v. 15, n. 2, p. 289–302, 2001.

GROSS, J. A. *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 995–9, 27 2000.

GU, D. *et al.* Raised expression of APRIL in Chinese patients with immune thrombocytopenia and its clinical implications. **Autoimmunity**, v. 42, n. 8, p. 692–698, 2009.

HAHNE, M. *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 6, p. 1185–90, 1998.

HAMZAOUI, K. *et al.* Serum BAFF levels and skin mRNA expression in patients with Behçet's disease. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 26, n. 4 Suppl 50, p. S64–71, 2008.

HILARIO-VARGAS, J. *et al.* Prevalence of anti-desmoglein-3 antibodies in endemic regions of Fogo selvagem in Brazil. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 9, p. 2044–2048, 2006.

HISAMATSU, Y. *et al.* Comparative study of autoantigen profile between Colombian and Brazilian types of endemic pemphigus foliaceus by various biochemical and molecular biological techniques. **Journal of dermatological science**, v. 32, n. 1, p. 33–41, 2003.

HUANG, G. *et al.* Downregulation of B lymphocyte stimulator expression by curcumin in B lymphocyte via suppressing nuclear translocation of NF- κ B. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 451–7, 2011.

HUARD, B. *et al.* APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 8, p. 2887–95, 2008.

INGOLD, K. *et al.* Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 9, p. 1375–83, 2005.

JACOB, C. O. *et al.* Dispensability of APRIL to the development of systemic lupus erythematosus in NZM 2328 mice. **Arthritis and rheumatism**, v. 64, n. 5, p. 1610–9, 2012.

JOHNSON, A. D. *et al.* SNAP: A web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2938–2939, 2008.

JONES, J. C. *et al.* Human autoantibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2781–5, 1984.

JORDAN, N.; D'CRUZ, D. P. Belimumab for the treatment of systemic lupus erythematosus. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 11, n. 2, p. 195–204, 2015.

KALANTARI-DEHAGHI, M. *et al.* Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57587, 2013.

KAWASAKI, A. *et al.* Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Genes and immunity**, v. 2, n. 5, p. 276–9, 2001.

KAWASAKI, A. *et al.* Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Genes and immunity**, v. 3, n. 7, p. 424–9, 2002.

KAWASAKI, A. *et al.* Role of APRIL (TNFSF13) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. **Rheumatology**, v. 46, n. 5, p. 776–782, 2007.

KIM, J. *et al.* Increased BCMA expression in lupus marks activated B cells, and BCMA receptor engagement enhances the response to TLR9 stimulation. **Autoimmunity**, v. 44, n. 2, p. 69–81, 2011.

KNIGHT, A. K. *et al.* High serum levels of BAFF, APRIL, and TACI in common variable immunodeficiency. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 124, n. 2, p. 182–9, 2007.

KOGA, H. *et al.* Five Japanese cases of antidesmoglein 1 antibody-positive and antidesmoglein 3 antibody-negative pemphigus with oral lesions. **The British journal of dermatology**, v. 166, n. 5, p. 976–80, 2012.

KÖHLER, K. F.; PETZL-ERLER, M. L. No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **International journal of immunogenetics**, v. 33, n. 2, p. 141–4, 2006.

KOYAMA, T. *et al.* A novel polymorphism of the human APRIL gene is associated with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 42, n. 8, p. 980–5, 2003.

KWON, E. J. *et al.* Anti-desmoglein IgG autoantibodies in patients with pemphigus in remission. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 9, p. 1070–1075, 2008.

LA, D. T. *et al.* B lymphocyte stimulator expression in patients with rheumatoid arthritis treated with tumour necrosis factor alpha antagonists: differential effects between good and poor clinical responders. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 8, p. 1132–8, 2008.

LAABI, Y. *et al.* The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 7, p. 1147–54, 1994.

LAABI, Y. *et al.* A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. **The EMBO journal**, v. 11, n. 11, p. 3897–904, 1992.

LAI KWAN LAM, Q. *et al.* Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 39, p. 14993–8, 2008.

LAURENT, S. A. *et al.* γ -secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. **Nature Communications**, v. 6, p. 7333, 2015.

LEE, Y. H. *et al.* APRIL polymorphism and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 46, n. 8, p. 1274–6, 2007.

LI, N. *et al.* The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501–10, 2003.

LIAO, M. *et al.* Genome-wide association study identifies common variants at TNFRSF13B associated with IgG level in a healthy Chinese male population. **Genes and immunity**, v. 13, n. 6, p. 509–13, 2012.

LIU, Y. *et al.* Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 383–94, 2002.

LOMBARDI, C. *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). “The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research”. **The Journal of investigative dermatology**, v. 98, n. 6, p. 847–50, 1992.

LÓPEZ-FRAGA, M. *et al.* Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. **EMBO reports**, v. 2, n. 10, p. 945–51, 2001.

LOSI, C. G. *et al.* Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. **Journal of clinical immunology**, v. 25, n. 5, p. 496–502, 2005.

MACKAY, F. *et al.* B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. **Immunological reviews**, v. 237, n. 1, p. 205–25, 2010.

MALHEIROS, D. *et al.* Genome-wide gene expression profiling reveals unsuspected molecular alterations in pemphigus foliaceus. **Immunology**, v. 143, n. 3, p. 381–95, 2014.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and immunity**, v. 10, n. 6, p. 547–58, 2009.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

MARTINEZ-GALLO, M. *et al.* TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 131, n. 2, p. 468–76, 2013.

MOORE, P. A. *et al.* BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5425, p. 260–3, 1999.

MORAES, M. E. *et al.* An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue antigens**, v. 49, n. 1, p. 35–40, 1997.

MOURA, R. A. *et al.* BAFF and TACI gene expression are increased in patients with untreated very early rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 40, n. 8, p. 1293–302, 2013.

MUKHOPADHYAY, A. *et al.* Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 23, p. 15978–81, 1999.

MUMCU, G. *et al.* Salivary and serum B-cell activating factor (BAFF) levels after hydroxychloroquine treatment in primary Sjögren's syndrome. **Oral health & preventive dentistry**, v. 11, n. 3, p. 229–34, 2013.

MURRELL, D. F. *et al.* Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 6, p. 1043–6, 2008.

NAKAHARA, T. *et al.* High Anti-Desmoglein 3 Antibody ELISA Index and Negative Indirect Immunofluorescence Result in a Patient With Pemphigus Vulgaris in Remission: Evaluation of the Antibody Profile by Newly Developed Methods. **JAMA dermatology**, v. 150, n. 12, p. 1327–30, 2014.

NOSSENT, J. C. *et al.* Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47, n. 9, p. 1311–6, 2008.

NOVAK, A. J. *et al.* Elevated serum B-lymphocyte stimulator levels in patients with familial lymphoproliferative disorders. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 6, p. 983–7, 2006.

O'CONNOR, B. P. *et al.* BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 1, p. 91–8, 2004.

OETH, P. *et al.* iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. **SEQUENOM® Application Note**, n. 8876-006, p. 1–12, 2007.

OROPALLO, M. A. *et al.* Beyond transitional selection: New roles for BLyS in peripheral tolerance. **Drug development research**, v. 72, n. 8, p. 779–787, 2011.

ORTEGA LOAYZA, A. G. *et al.* Antibodies against desmoglein 1 in healthy subjects in endemic and nonendemic areas of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Peru. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 5, p. 538–542, 2006.

OSMAN, W. *et al.* Association of common variants in TNFRSF13B, TNFSF13, and ANXA3 with serum levels of non-albumin protein and immunoglobulin isotypes in Japanese. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e32683, 2012.

PATEL, D. R. *et al.* Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 16, p. 16727–35, 2004.

PAVONI, D. P. *et al.* Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and immunity**, v. 4, n. 2, p. 110–6, 2003.

PAVONI, D. P. *et al.* Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 39, n. 9, p. 1227–32, 2006.

PEREIRA, N. F. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, n. 6, p. 233–41, 2004.

PETZL-ERLER, M. L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **Journal of autoimmunity**, v. 25, n. 2, p. 121–5, 2005.

PETZL-ERLER, M. L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue antigens**, v. 33, n. 3, p. 408–14, 1989.

PINCERATI, M. R.; DALLA-COSTA, R.; PETZL-ERLER, M. L. CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 3, p. 442–4, 2010.

PIOVEZAN, B. Z.; PETZL-ERLER, M. L. Both qualitative and quantitative genetic variation of MHC class II molecules may influence susceptibility to autoimmune diseases: The case of endemic pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1134–1140, 2013.

PRADET-BALADE, B. *et al.* An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. **The EMBO journal**, v. 21, n. 21, p. 5711–20, 2002.

PROBST, C. M. *et al.* HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human biology**, v. 72, n. 4, p. 597–617, 2000.

PRÜSSMAN, J. *et al.* Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 7, p. 519–521, 2014.

PURCELL, S. *et al.* PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, 2007.

QIAN, Y. *et al.* Cutting Edge: Brazilian pemphigus foliaceus anti-desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sand fly salivary LJM11 antigen. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 4, p. 1535–9, 2012.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**, 2014.

RICHEZ, C. *et al.* Atacicept as an investigated therapy for rheumatoid arthritis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1285–1294, 2014.

ROCK, B. *et al.* The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The New England journal of medicine**, v. 320, n. 22, p. 1463–9, 1989.

ROETTO, A. *et al.* A frequent polymorphism in the 5' region of the BCMA gene. **Molecular and cellular probes**, v. 11, n. 4, p. 311–2, 1997.

ROSCHKE, V. *et al.* BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. **Journal of immunology**, v. 169, n. 8, p. 4314–21, 2002.

ROXO, V. M. M. S. *et al.* Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus--are there any associations? **Tissue antigens**, v. 62, n. 5, p. 394–400, 2003.

SADA, P. R.; ISENBERG, D.; CIURTIN, C. Biologic treatment in Sjogren's syndrome. **Rheumatology**, v. 54, n. 2, p. 219–230, 2015.

SAKURAI, D. *et al.* TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2961–7, 2007.

SALZER, U. *et al.* Sequence analysis of TNFRSF13b, encoding TACI, in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of clinical immunology**, v. 27, n. 4, p. 372–7, 2007.

SALZER, U. *et al.* Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1967–76, 2009.

SANTI, C. G.; SOTTO, M. N. Immunopathologic characterization of the tissue response in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 3, p. 446–50, 2001.

SCHNEIDER, P. *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 11, p. 1747–56, 1999.

SCHWALLER, J. *et al.* Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 331–8, 2007.

SELLAM, J. *et al.* Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 6, p. 790–7, 2007.

SEYLER, T. M. *et al.* BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 11, p. 3083–92, 2005.

SHU, H. B.; HU, W. H.; JOHNSON, H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. **Journal of leukocyte biology**, v. 65, n. 5, p. 680–3, 1999.

SMOLEN, J. S. *et al.* Efficacy and safety of tabalumab, an anti-B-cell-activating factor monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis who had an inadequate response to methotrexate therapy: results from a phase III multicentre, randomised, double-blind study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 2015.

STANLEY, J. R.; KLAUS-KOVTUN, V.; SAMPAIO, S. A. Antigenic specificity of fogo selvagem autoantibodies is similar to North American pemphigus foliaceus and distinct from pemphigus vulgaris autoantibodies. **The Journal of investigative dermatology**, v. 87, n. 2, p. 197–201, 1986.

STEIN, J. V. *et al.* APRIL modulates B and T cell immunity. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 12, p. 1587–98, 2002.

STOHL, W. *et al.* B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. **Arthritis and rheumatism**, v. 48, n. 12, p. 3475–86, 2003.

STOHL, W. *et al.* Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 9, p. 1096–103, 2004.

THOMPSON, J. S. *et al.* BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5537, p. 2108–11, 2001.

TRIBOULEY, C. *et al.* Characterization of a new member of the TNF family expressed on antigen presenting cells. **Biological chemistry**, v. 380, n. 12, p. 1443–7, 1999.

VON BÜLOW, G. U. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of murine transmembrane activator and CAML interactor (TACI) with chromosomal localization in human and mouse. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 11, n. 8, p. 628–32, 2000.

WAGENLEITER, S. E. N. *et al.* On the genetic involvement of apoptosis-related genes in Crohn's disease as revealed by an extended association screen using 245 markers: no evidence for new predisposing factors. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 4, p. 8, 2005.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D930–4, 2012.

WARREN, S. J. *et al.* The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 23–30, 2000.

WATANABE, R. *et al.* Increased serum levels of a proliferation-inducing ligand in patients with bullous pemphigoid. **Journal of dermatological science**, v. 46, n. 1, p. 53–60, 2007.

WEISS, D. *et al.* Autoantibody Levels and Clinical Disease Severity in Patients with Pemphigus: Comparison of Aggregated Anti-desmoglein ELISA Values and Indirect Immunofluorescence Titres. **Acta Dermato Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 559–564, 2015.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of human genetics**, v. 19, n. 4, p. 251–3, 1955.

YAN, M. *et al.* Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. **Current biology : CB**, v. 11, n. 19, p. 1547–52, 2001.

YANG, M. *et al.* Genome-wide scan identifies variant in TNFSF13 associated with serum IgM in a healthy Chinese male population. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47990, 2012.

YU, G. *et al.* APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. **Nature immunology**, v. 1, n. 3, p. 252–6, 2000.

ZAYED, R. A *et al.* B-cell activating factor promoter polymorphisms in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 43, n. 3, p. 289–94, 2013.

ZHAI, K. *et al.* Cytokine BAFF gene variation is associated with survival of patients with T-cell lymphomas. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 8, p. 2250–6, 2012.

ZHANG, J. *et al.* Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 1, p. 6–10, 2001.

ZHAO, L. D. *et al.* Expressions of BAFF/BAFF receptors and their correlation with disease activity in Chinese SLE patients. **Lupus**, v. 19, n. 13, p. 1534–49, 2010.

ZHOU, Z. *et al.* BAFF and BAFF-R of peripheral blood and spleen mononuclear cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. **Autoimmunity**, v. 42, n. 2, p. 112–9, 2009.

ZHOU, Z. *et al.* Direct B-cell stimulation by peripheral blood monocyte-derived Dendritic cells in idiopathic thrombocytopenic purpura patients. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 6, p. 814–822, 2010.

ZHU, X. *et al.* High-dose dexamethasone inhibits BAFF expression in patients with immune thrombocytopenia. **Journal of clinical immunology**, v. 29, n. 5, p. 603–10, 2009.

ZHUKOVSKY, E. A. *et al.* TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster? **Nature**, v. 427, n. 6973, p. 413–4; discussion 414, 2004.

ZOLLARS, E. *et al.* BAFF (B cell activating factor) transcript level in peripheral blood of patients with SLE is associated with same-day disease activity as well as global activity over the next year. **Lupus science & medicine**, v. 2, n. 1, p. e000063, 2015.

ANEXO I

Artigo aceito para publicação em 09 de dezembro de 2015 na revista “Clinical Laboratory”, volume 07/2016, o qual deve ser considerado a fonte original da publicação e o qual deve ser utilizado para fins de citação.

Anti-desmoglein 1 and 3 Autoantibody Levels in Endemic Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris from Brazil

Liana Alves de Oliveira¹, Alfredo Marquart Filho², Gerson Trevilato², Rodolfo Pessato Timóteo³, Maira Mukai⁴, Ana Maria Ferreira Roselino⁵, Maria Luiza Petzl-Erler¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;

²Hospital Adventista do Pênfigo, Campo Grande, Brazil;

³Hospital do Fogo Selvagem - Lar da Caridade, Uberaba, Brazil;

⁴Serviço de Dermatologia do Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;

⁵Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil

Correspondence to:

Professor Maria-Luiza Petzl-Erler, PhD

Departamento de Genética - Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071

81531-980 Curitiba, Brazil

+55 (41) 3361-1746 (office); +55 (41) 3361-1793 (fax)

e-mail: perler@ufpr.br

Reprints will not be available from the author

Financial Support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Declaration of Interest - None to declare

Running title: Anti-DSG1 and anti-DSG3 in endemic pemphigus

SUMMARY

BACKGROUND: Pemphigus is a group of autoimmune blistering diseases of which the major forms are pemphigus foliaceus (PF) and vulgaris (PV). In Brazil, PF occurs in an endemic form also known as *fogo selvagem*. The main autoantibody in PF is against desmoglein 1 (DSG1), while in PV the main antibody is anti-desmoglein 3 (DSG3), but often anti-DSG1 is also present. The aim of the present study was to analyze the levels of anti-DSG1 and anti-DSG3 autoantibodies in Brazilian PF and PV patients, considering different stages of the disease for PF patients and comparing these levels to those of healthy individuals living in and outside the endemic regions.

METHODS: Levels of anti-DSG1 and anti-DSG3 were measured in the sera of Brazilian PF (n = 68) and PV (n = 20) patients as well as in clinically healthy (control) individuals (n = 48) by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Comparisons were made using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

RESULTS: As expected, anti-DSG1 was more prevalent among PF patients (84% against 43% in PV), while anti-DSG3 was more prevalent in PV patients (50% against 4% in PF). Levels of anti-DSG1 in PF patients in remission differed from those in patients undergoing active disease ($P = 0.003$), and patients in long-term remission (more than two years without presenting new lesions) were similar to control individuals living in the endemic region and surrounding area ($P = 0.09$). Moreover, patients with a more severe form of the disease had higher levels of anti-DSG1 (at least 134 U/mL, mean of 233 U/mL) than patients with a less severe form (fewer lesions). **CONCLUSIONS:** Despite the importance of these antibodies for diagnosis and management purposes, their presence in a healthy individual and in patients under remission indicates that caution should be taken, especially in endemic areas.

KEY WORDS

pemphigus; fogo selvagem; autoantibodies; seroprevalence; anti-desmoglein; autoimmunity

INTRODUCTION

Pemphigus foliaceus (PF) and pemphigus vulgaris (PV) are the major types of pemphigus, a group of autoimmune diseases of the epidermis characterized by acantholysis, the rupture of the cellular junctions among keratinocytes, resulting in epidermal blisters and erosions. In PF, skin lesions are superficial, while in PV the blisters originate in deep layers of the epidermis. Pemphigus patients develop autoantibodies against various self-antigens [1–4]. Of these, pathogenic antibodies against the ectodomains of desmogleins (DSG) are the most important. The desmogleins are calcium-dependent cell-adhesion glycoproteins of the desmosome and members of the major cadherin gene family. In PF, the main autoantibody is against DSG1 [5]. PV patients with only mucosal lesions tend to have autoantibodies against DSG3, whilst PV patients with mucocutaneous lesions usually have autoantibodies against both DSG1 and DSG3 [6].

Pemphigus occurs at low incidence worldwide, and PV is the major form in most geographic regions. Yet, PF is endemic in Brazil, especially in the Midwest of the country [7]. Brazilian endemic PF is also known as *fogo selvagem*, and this is the form of PF analysed in the present study. In the endemic region, also individuals without pemphigus may have antibodies against desmogleins [8,9], indicating that an environmental factor triggers the immune response against desmogleins, but the pathogenic response only evolves in genetically predisposed individuals. Interestingly, rise of incidence of PV in some regions where PF is endemic has been reported, leading to the suggestion of an endemic form of PV [10,11].

In the present study, we aimed to verify the levels of anti-DSG1 and anti-DSG3 in PF and PV patients, and in healthy individuals that reside both in and out the endemic region.

MATERIALS AND METHODS

The patients sample was composed of 68 PF patients and 20 PV patients. Controls (n = 48) were individuals with no autoimmune disease and no consanguineous relatives with pemphigus. For nine patients (8 PF and 1 PV), more than one serum sample was available. Blood samples were collected between 2011 and 2014 in one of the following locations: Hospital Adventista do Pênfigo (HAP), Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul; Hospital das Clínicas of the Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto, Universidade de São Paulo (FMRP), Ribeirão Preto, state of São Paulo; Lar da Caridade Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba (HFSU), Uberaba, state of Minas Gerais; Hospital de Clínicas and Laboratório de Genética Molecular Humana of the Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, state of Paraná (Supplementary Table 1). After serum isolation, samples were stored at -70°C until use. Healthy control individuals were subdivided in individuals from the endemic region and surroundings (CE, n = 9), and individuals living outside the endemic region (Controls, n = 39).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits, MBL® (RG-M7593-D and RG-7680-EC-D), were used to measure anti-DSG1 (in all samples) and anti-DSG3 (in 50 patients and 33 control individuals) levels in the serum, following manufacturer's instructions. The cutoff value for a sample to be considered positive is 20 U/mL. Some samples were tested at least twice (22 for anti-DSG1, and 2 for anti-DSG3), providing very similar results (maximum standard deviation of 1.9 U/mL among negative individuals, and of 49 U/mL among positives, never changing the interpretation).

For analysis, PF patients were divided in four subgroups: patients presenting lesions and under immunosuppressive treatment on blood sampling (PFCLCT, n = 43), patients presenting lesions in the absence of immunosuppressive treatment (PFCLST, n = 5); patients without lesions and under immunosuppressive treatment (PFSLCT, n = 11); and patients without lesions and not under immunosuppressive treatment (PFSLST, n = 14). All PV patients had lesions and were under immunosuppressive treatment when contacted. In addition, PF patients were classified according to severity of lesions or time without presenting new lesions: 1) patients with many skin lesions (n = 6); 2) patients with few isolated lesions, or cicatrizing lesions (n = 42); 3) patients not presenting new lesions for a maximum of 18 months (n = 14); 4) patients not presenting new lesions for more than two years (n = 7). PV patients were classified in mucosal only (n = 10), cutaneous only (n = 4), and mucocutaneous (n = 4), according to the location of the lesions on the moment of blood sampling.

When different samples were available for the same individual, if conditions were similar between the occasions (i.e. individual with the same age, patient under similar immunosuppressive dosage and similar severity of the disease), a mean of the data was used in the analysis. However, if conditions differed, the different data were kept for analysis (Supplementary Table 1).

Spearman correlation was estimated between age and antibody levels [12]. As the correlation was low ($\rho = -0.29$, $P = 0.0145$), the age was not considered in further analysis.

Autoantibody levels were compared among subgroups by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, in R platform, package *stats* versions 2.15.3 and 3.2.0 [12]. Kruskal-Wallis was also used to compare antibody levels among patients under different doses of immunosuppressive treatment (Prednisone). Box plot and dot plot graphs were generated in R, packages *fields* version 3.3.1 and *graphics* version 3.2.0 [12].

RESULTS

Anti-DSG1 and anti-DSG3 levels were measured in PF and PV patients as well as in control individuals (Supplementary Table 1). Of the clinically healthy (control) individuals, only one living in an endemic region was positive for both autoantibodies (49 U/mL of anti-DSG1 and 64 U/mL of anti-DSG3). The other control individuals were negative for anti-DSG1 and, when tested, also negative for anti-DSG3. Anti-DSG1 antibody was observed in most PF patients (61/73, 84%) but in less than half of the PV patients (9/21, 43%). Of the patients tested for the presence of anti-DSG3, 4 out of 8 (50%) PV patients and 2 out of 46 (4.4%) PF patients were positive. These two PF patients (one from subgroup PFCLST and group 1; the other from subgroup PFSLST and group 4) presented both antibodies. Of the four PV patients positive for anti-DSG3, two were positive also for anti-DSG1, and two were negative. The four PV patients negative for anti-DSG3 were also negative for anti-DSG1.

The comparison among all subgroups showed significant differences of both anti-DSG1 ($P < 2.2 \times 10^{-16}$, Figure 1) and anti-DSG3 ($P = 0.0003$, Figure 2) levels. As only two PF patients were positive for anti-DSG3, one presenting lesions and the other not, PF patients were considered as a single group for statistical analysis concerning this autoantibody. Pairwise comparisons between groups are shown in Tables 1 and 2. For anti-DSG1, among PF subgroups, only the patients without lesions and not taking any immunosuppressive treatment (PFSLST) at the time of blood sampling differed from the other PF subgroups. The two subgroups of PF patients presenting lesions, either under immunosuppressive treatment (PFCLCT) or not (PFCLST), did not differ from each other, nor from treated patients without lesions (PFSLCT). For anti-DSG3, PV

patients differed from PF patients and from controls. Control individuals from endemic areas did not differ significantly from PF patients.

When comparing PF patients regarding the severity of lesions or time without lesions (Figure 3), a significant difference of anti-DSG1 levels was observed ($P = 0.0002$). Pairwise comparisons showed that patients with no lesions for a time shorter than 18 months (group 3 in Table 3) differed from patients with lesions (groups 1 and 2), but the difference between patients with few lesions or lesions already healing (group 2) was close to the significance limit ($P = 0.048$, Table 3) and may have occurred by chance.

Twenty PV patients were analyzed, but for three of them there was no information on the type of lesions (mucosal or cutaneous). For the other PV patients, there was a clear tendency of those with cutaneous lesions to present anti-DSG1 at higher levels (at least 80 U/mL). Only two individuals with mucosal lesions only were positive for anti-DSG1, both with low levels (under 50 U/mL). Among the patients with mucocutaneous lesions, one was negative for anti-DSG1, but the other three presented high levels (above 80 U/mL). There were also four patients with only cutaneous lesions, two of which presented high levels of anti-DSG1 (above 110 U/mL). The other two were negative, but presented fewer lesions and were already under lower dosage of immunosuppressive treatment.

Usually, patients with a more severe disease receive higher doses of immunosuppressive treatment. The most common treatment delivered to pemphigus patients in Brazil is prednisone. Doses of prednisone were used to group patients, but no significant difference was observed among these groups regarding the levels of DSG1 ($P = 0.5102$), even when only PF patients were considered ($P = 0.217$, Figure 4).

DISCUSSION

The individuals included in the present study were from a broad geographic area where PF is endemic, extending over the states of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo and Paraná. Previous analyses of the serum levels of anti-DSG1 and anti-DSG3 antibodies in Brazilian endemic PF patients were conducted in individuals living in Limão Verde, an Amerindian reservation area with the highest prevalence of PF ever reported (3.4%), and in the surrounding region [8,9].

Not surprisingly, anti-DSG3 and anti-DSG1 were more prevalent in PV and in PF, respectively. Anti-DSG1 levels differed significantly between PF and PV, between patients and healthy controls and between the subgroup of patients with no lesions and no immunosuppressive treatment (PFSLST) and other PF subgroups. Interestingly, this subgroup did not differ from the group of control individuals living in the endemic region (CE), although the *P* value was close to the significance limit (0.055). When patients were classified by time without presenting new lesions, the CE subgroup did not differ from the group without lesions for two or more years (group 4). Therefore, the antibody profile of clinically healthy individuals from the endemic region is similar to the profile of patients in remission, especially in prolonged clinical remission, here defined as absence of new lesions for two years or longer.

Patients with few lesions (group 2) were not that different for anti-DSG1 levels in serum from patients not presenting new lesions for a short period of time (group 3), who are in most cases still under immunosuppressive treatment. This last group is indeed very variable, as can be observed in Figure 3. This result reflects the difficulties of identifying active disease at this transition point, when patients are already recovering, but still at risk of relapsing.

The presence of autoantibodies in remission has been reported for endemic and sporadic PF [13–16]. Usually, remission is defined as just a few lesion-free months, or time is not even taken into account. Nonetheless, despite differences of methodology, all studies report a considerable number of patients remaining positive during remission. In the present work, of the 25 PF patients not presenting lesions, 15 (60%) were positive for anti-DSG1. If only patients already out of immunosuppressive treatment are considered, 5 (38.5%) were positive. Of the 7 patients without lesions for more than two years, 2 (28.6%) were positive. In Japan, Kwon *et al.* [14] observed 1 (16.7%) PF patient positive for anti-DSG1 in remission, when defining remission as no new lesions for at least 3 months and 5 mg/day or less of immunosuppressive treatment. However, we observed that patients in long-term remission are similar to the healthy individuals from the endemic region but differ significantly from patients with active disease. Because of significant physiological and immunological differences between patients in short time and in prolonged clinical remission, lesion-free and treatment-free time should be considered in future studies of immune responses after clinical remission.

A yet intriguing question is why anti-DSG levels remain positive in remission. As PV is less rare than PF worldwide, more studies are available for PV patients, where it has been shown that anti-DSG3 antibodies in remission are detected by conventional ELISA but not by conformational ELISA [17]. This indicates that the antibodies detected in remission may not be pathogenic. However, the same study did not find differences in conventional and conformational ELISA levels for anti-DSG1 antibodies. Additionally, several studies found that anti-DSG1 levels correlate with disease activity better than anti-DSG3 levels, both for PV and PF patients [18,19]. For PF, Warren *et al.* [20] showed that IgG4 levels increase significantly more than other IgG subclasses during active disease, however, both healthy individuals from the endemic area and PF patients in remission still presented IgG4 anti-DSG1. Therefore, antibodies detected in patients in long-term remission, as well as those from control individuals, possibly are non-pathogenic. Alternatively, some patients in clinical short-term remission (no lesions for about 2 months) may still present circulating pathogenic autoantibodies. Follow-up studies including a large number of patients for a long period could help deciding whether anti-DSG levels should be considered to establish when to withdraw the immunosuppressive treatment.

In the present study, 1 out of 9 (11%) healthy controls of the endemic region was positive for anti-DSG1 and anti-DSG3. The positive individual was born and lives in the state of São Paulo. The occurrence of anti-DSG1 autoantibodies in healthy individuals from São Paulo state was reported by Warren *et al.* [8], who found 5 (21%) positive individuals. In the surroundings of Limão Verde, 54 (19%) healthy individuals presented anti-DSG1 [8]. Hilario-Vargas *et al.* [9] observed anti-DSG3 antibodies in 8 (5.7%) healthy individuals in the area surrounding Limão Verde, but none of 18 healthy individuals from São Paulo state had anti-DSG3. In healthy individuals living close to an endemic focus of PF in Peru, 5 (12%) were positive for anti-DSG1; while in the endemic focus, 13 (32%) of the healthy individuals had anti-DSG1 [21]. Besides, anti-DSG antibodies have also been reported in 0.1% to 0.7% of random blood donors from non-endemic regions [22,23]. These results indicate that caution should be taken when using the autoantibodies for diagnosis, particularly for individuals living in the endemic region, or close to it.

Pemphigus Foliaceus patients may also present anti-DSG3 autoantibodies, as was observed in the present work. Two out of the 46 (4.4%) tested PF patients were

positive for anti-DSG3. One of them had high levels (above 170 U/mL) of both tested autoantibodies, while in the other both values were close to the cutoff level. This second patient was in remission and did not present new lesions for about 10 years. Arteaga *et al.* [24] observed anti-DSG3 in one out of 35 (2.9%) non-endemic PF and in 18 (7.5%) endemic PF patients. Li *et al.* [17] found PV patients with cutaneous lesions only that were positive for anti-DSG3 and suggested that it may happen because the oral mucosa has a higher expression of DSG3. For some cases of PV patients with anti-DSG3 antibodies but no mucosal lesions, these antibodies were shown to be less pathogenic [25]. On the other hand, occurrence of anti-DSG3 antibodies in PF patients is yet poorly understood. Nevertheless, the proportion of PF patients presenting anti-DSG3 is not negligible and the presence of this autoantibody is not recommended as the principal criterion for differential diagnosis. The presence of anti-DSG3 is highest in Limão Verde, where endemic PF reaches the startling prevalence of 3.4% and 9 of 21 (43%) patients had anti-DSG3 [9].

A high frequency of PV patients with cutaneous lesions presents anti-DSG1 antibodies [6]. We observed that PV patients with cutaneous or mucocutaneous lesions had higher frequency (5 of 8, 62.5%) and higher levels (111 to 153 U/mL) of anti-DSG1 in comparison to those with only mucosal lesions (2 of 10, 20%; 21 and 46 U/mL), but three (37.5%) of them were negative. On the other hand, two of five PV patients with the disease localized to the mucous membranes were negative for anti-DSG3. Cases of PV patients with mucosal lesions only that were negative for anti-DSG3 were previously reported [26]. In a similar situation, Kamiya *et al.* [27] used super concentrated sera and found positive results.

To conclude, almost all endemic PF patients presenting lesions had a positive ELISA test for anti-DSG1, but the same is not true for anti-DSG3 in PV patients. PF patients undergoing a more severe disease tend to have higher levels of anti-DSG1, but the levels are not significantly related to doses of immunosuppressive treatment. Furthermore, levels of anti-DSG1 are very variable among PF patients with few lesions or not presenting new lesions for a short time. Patients in long-term clinical remission (more than two years) are similar to healthy individuals of endemic areas for their autoantibody levels.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the individuals that participated as volunteers and made this work possible. We appreciate all the help, support, and friendship from our colleagues of the Laboratório de Genética Molecular Humana, UFPR. We are grateful for the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Nguyen VT, Ndoeye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin: A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 2000;275(38):29466–76.
2. Tirado-Sánchez A, Vázquez-González D, Ponce-Olivera RM, López-Lozano HE. Acetylcholine receptor antibodies in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. *Dermatol Online J* 2012;18(5):14.
3. Evangelista F, Dasher DA, Diaz LA, Prisayanh PS, Li N. E-cadherin is an additional immunological target for pemphigus autoantibodies. *J Invest Dermatol* 2008;128(7):1710–8.
4. Kalantari-Dehaghi M, Anhalt GJ, Camilleri MJ, Chernyavsky AI, Chun S, Felgner PL, et al. Pemphigus vulgaris autoantibody profiling by proteomic technique. *PLoS One* 2013;8(3):e57587.
5. Stanley JR, Koulu L, Thivolet C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 1984;74(2):313–20.
6. Ding X, Aoki V, Mascaro JM, Lopez-Swidorski A, Diaz LA, Fairley JA. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 1997;109(4):592–6.
7. Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, et al. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol* 1989;92(1):4–12.
8. Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, et al. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *N Engl J Med* 2000;343(1):23–30.
9. Hilario-Vargas J, Dasher DA, Li N, et al. Prevalence of anti-desmoglein-3 antibodies in endemic regions of Fogo selvagem in Brazil. *J Invest Dermatol* 2006;126(9):2044–8.
10. Gonçalves GAP, Brito MMC, Salathiel AM, Ferraz TS, Alves D, Roselino AMF. Incidence of pemphigus vulgaris exceeds that of pemphigus foliaceus in a region where pemphigus foliaceus is endemic: analysis of a 21-year historical series. *An Bras Dermatol* 2011;86(6):1109–12.
11. Rocha-Alvarez R, Ortega-Loayza AG, Friedman H, et al. Endemic pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 2007;143(7):895–9.

12. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria. 2014; Available from: <http://www.r-project.org/>
13. Aoki V, Huang MHT, Périgo AM, et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) and pemphigus vulgaris: immunoglobulin G heterogeneity detected by indirect immunofluorescence. *Rev do Hosp das Clin da Fac Med Sao Paulo* 2004;59(5):251–6.
14. Kwon EJ, Yamagami J, Nishikawa T, Amagai M. Anti-desmoglein IgG autoantibodies in patients with pemphigus in remission. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2008;22(9):1070–5.
15. Dhandha MM, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, morphology, duration and HLA association in Pemphigus vulgaris. *Autoimmunity* 2012;45(7):516–26.
16. Nakahara T, Takagi A, Yamagami J, et al. High Anti-Desmoglein 3 Antibody ELISA Index and Negative Indirect Immunofluorescence Result in a Patient With Pemphigus Vulgaris in Remission: Evaluation of the Antibody Profile by Newly Developed Methods. *JAMA dermatology* 2014;150(12):1327–30.
17. Li Z, Zhang J, Xu H, Jin P, Feng S, Wang B. Correlation of Conventional and Conformational Anti-desmoglein Antibodies with Phenotypes and Disease Activities in Patients with Pemphigus Vulgaris. *Acta Derm Venereol* 2015;95(4):462–5.
18. Patsatsi A, Kyriakou A, Giannakou A, Pavlitou-Tsiontsi A, Lambropoulos A, Sotiriadis D. Clinical significance of anti-desmoglein-1 and -3 circulating autoantibodies in pemphigus patients measured by Area Index and Intensity Score. *Acta Derm Venereol* 2014;94(2):203–6.
19. Weiss D, Ristl R, Griss J, et al. Autoantibody Levels and Clinical Disease Severity in Patients with Pemphigus: Comparison of Aggregated Anti-desmoglein ELISA Values and Indirect Immunofluorescence Titres. *Acta Derm Venereol* 2015;95(5):559–64.
20. Warren SJP, Arteaga LA, Rivitti EA, et al. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 2003;120(1):104–8.
21. Ortega Loayza AG, Ramos W, Elgart G, et al. Antibodies against desmoglein 1 in healthy subjects in endemic and nonendemic areas of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Peru. *Int J Dermatol* 2006;45(5):538–42.
22. Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: Correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol* 2010;19(5):458–63.

23. Prüßmann W, Prüßmann J, Koga H, et al. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. *Orphanet J Rare Dis* 2015;10(1):63.
24. Arteaga LA, Prisayanh PS, Warren SJP, Liu Z, Diaz LA, Lin MS. A subset of pemphigus foliaceus patients exhibits pathogenic autoantibodies against both desmoglein-1 and desmoglein-3. *J Invest Dermatol* 2002;118(5):806–11.
25. Saleh MA, Hashimoto R, Kase Y, Amagai M, Yamagami J. Low pathogenicity of anti-desmoglein 3 immunoglobulin G autoantibodies contributes to the atypical clinical phenotypes in pemphigus. *J Dermatol* 2015; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1346-8138.12888>
26. Koga H, Ohyama B, Tsuruta D, et al. Five Japanese cases of antidesmoglein 1 antibody-positive and antidesmoglein 3 antibody-negative pemphigus with oral lesions. *Br J Dermatol* 2012;166(5):976–80.
27. Kamiya K, Aoyama Y, Yamaguchi M, et al. Clues to diagnosis for unusual mucosal pemphigus demonstrating undetectable anti-desmoglein 3 serum antibodies by routine tests. *J Dermatol* 2015;42(6):572–9.

Table 1. *P* values for pairwise comparisons of anti-DSG1 levels in serum of subgroups of pemphigus patients and control individuals.

	CE (n = 9)	Controls (n = 39)	PFCLCT (n = 43)	PFCLST (n = 5)	PFSLCT (n = 11)	PFSLST (n = 14)
Controls	0.2193					
PFCLCT	0.00001	1.60E-13				
PFCLST	0.0033	0.0003	0.6855			
PFSLCT	0.0014	0.00001	0.5055	0.4278		
PFSLST	0.0546	0.0002	0.000005	0.0035	0.0041	
PV (n = 21)	0.0145	0.000001	3.40E-08	0.0011	0.0020	0.9731

CE: clinically healthy individuals that live in the endemic region; Controls: clinically healthy individuals living outside the endemic region; PFCLCT: patients presenting lesions and under immunosuppressive treatment; PFCLST: patients presenting lesions but not under immunosuppressive treatment; PFSLCT: patients not presenting lesions and under immunosuppressive treatment; PFSLST: patients not presenting lesions and not under immunosuppressive treatment; n: number of individuals.

Table 2. *P* values for pairwise comparisons of anti-DSG3 levels in serum of pemphigus patients and control individuals.

	CE (n = 8)	Controls (n = 25)	PF (n = 46)
Controls	0.0372		
PF	0.7886	0.0045	
PV (n = 8)	0.0406	0.0006	0.0035

CE: clinically healthy individuals that live in the endemic region; Controls: clinically healthy individuals living outside the endemic region; PF: pemphigus foliaceus patients; PV: pemphigus vulgaris patients; n: number of individuals.

Table 3. *P* values for pairwise comparisons of anti-DSG1 levels in PF patients classified according to severity of lesions or time without lesions and control individuals from the endemic region.

	1	2	3	CE
2	0.11542			
3	0.01188	0.048		0.0089
4	0.00341	0.0002	0.07957	0.0901

1) patients with many skin lesions; 2) patients with few isolated lesions, or cicatrizing lesions; 3) patients not presenting new lesions for a maximum of 18 months; 4) patients not presenting new lesions for more than 2 years; CE: control individuals that live in the endemic region.

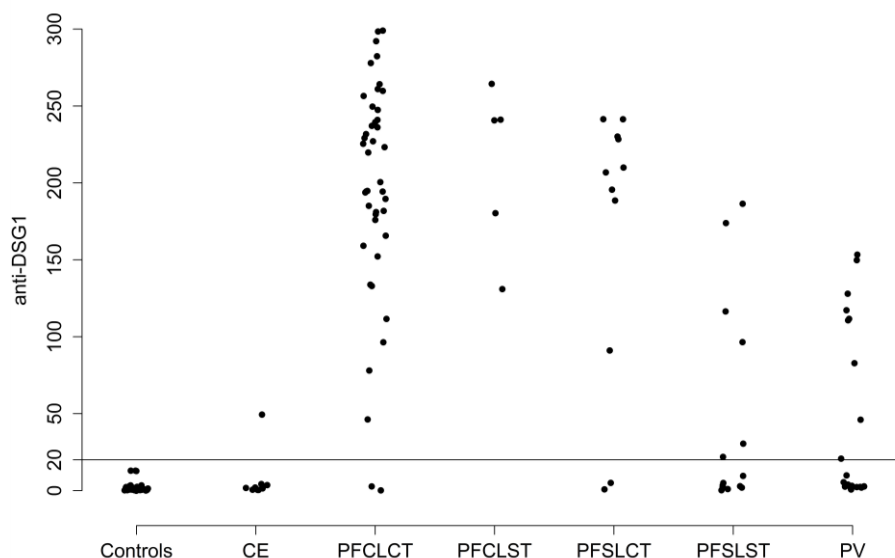


Figure 1. Levels of anti-DSG1 (U/mL) in pemphigus patients and control individuals

Controls: clinically healthy individuals living outside the endemic region; CE: clinically healthy individuals that live in the endemic region; PFCLCT: patients presenting lesions and under immunosuppressive treatment; PFCLST: patients presenting lesions but not under immunosuppressive treatment; PFSLCT: patients not presenting lesions and under immunosuppressive treatment; PFSLST: patients not presenting lesions and not under immunosuppressive treatment. Comparison among groups: $P < 2.2 \times 10^{-16}$.

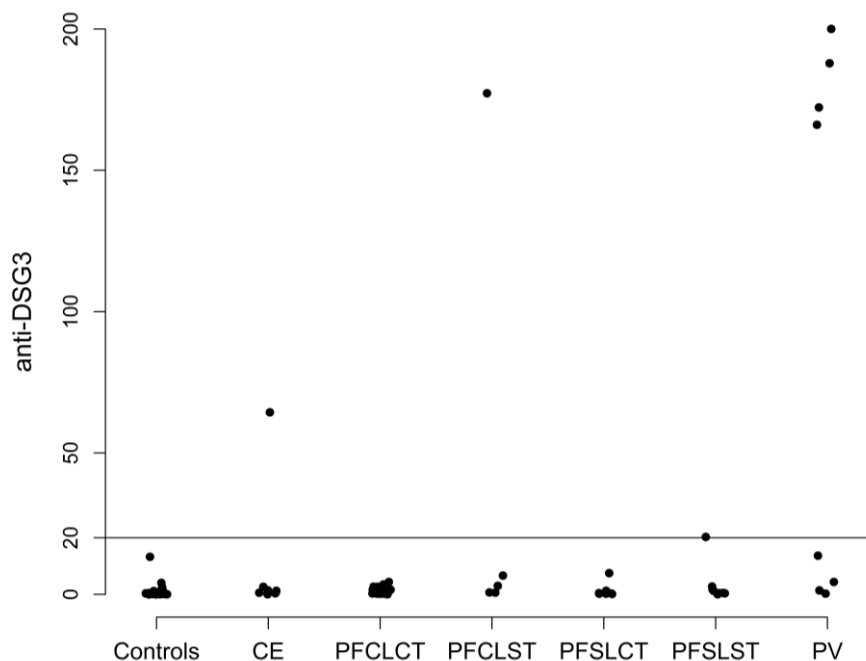


Figure 2. Levels of anti-DSG3 (U/mL) in pemphigus patients and control individuals

Controls: clinically healthy individuals living outside the endemic region; CE: clinically healthy individuals that live in the endemic region; PFCLCT: patients presenting lesions and under immunosuppressive treatment; PFCLST: patients presenting lesions but not under immunosuppressive treatment; PFSLCT: patients not presenting lesions and under immunosuppressive treatment; PFSLST: patients not presenting lesions and not under immunosuppressive treatment. Comparison among groups: $P = 0.0006$.

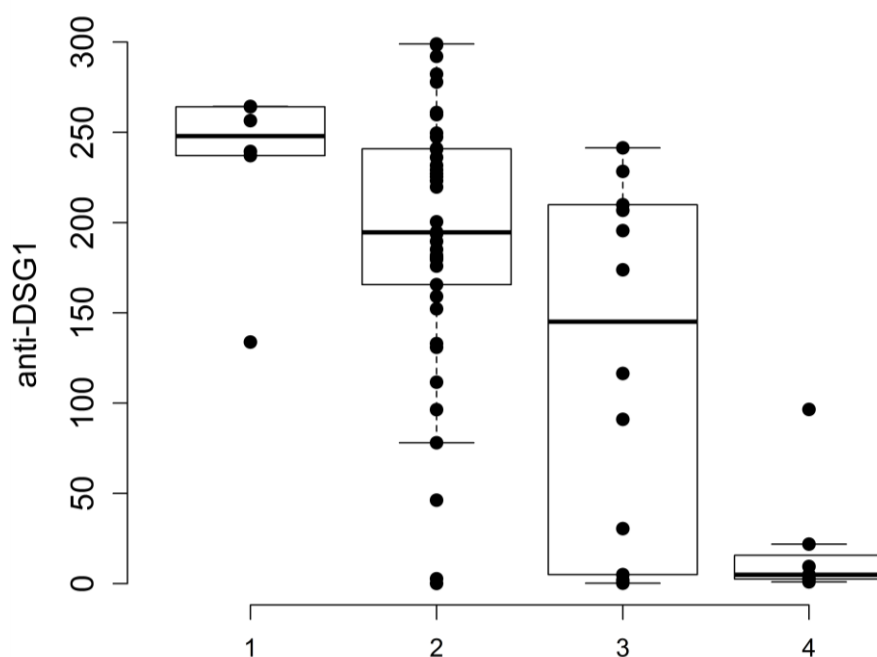


Figure 3. Levels of anti-DSG1 (U/mL) in PF patients classified according to severity of lesions or time without new lesions

1) patients with many skin lesions; 2) patients with few isolated lesions, or lesions already under cicatrization; 3) patients not presenting new lesions for a maximum of 18 months; 4) patients not presenting new lesions for more than 2 years. Comparison among groups: $P = 0.0002$.

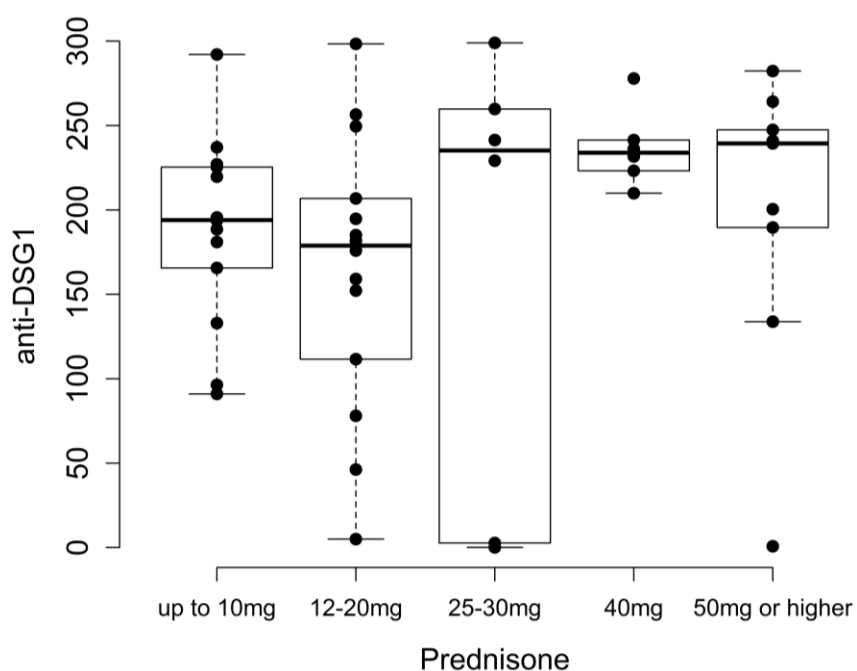


Figure 4. Levels of anti-DSG1 (U/mL) in PF patients classified according to the daily dose of immunosuppressive treatment

Comparison among groups: $P = 0.217$.

Supplementary Table 1. Anti-DSG1 and anti-DSG3 levels in serum of pemphigus patients and control individuals

Controls not from endemic areas (Controls)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
C024JCM	UFPR	62	M		0.17	neg	-0.08	neg
C043MLP	UFPR	60	F		0.41	neg	0.00	neg
C068NBP	UFPR	58	F		0.59	neg		
C074KAB	UFPR	44	F		3.35	neg		
C096ALS	UFPR	42	F		12.87	neg	13.25	neg
C099ABB	UFPR	41	F		1.79	neg	0.32	neg
C100VSR	UFPR	56	F		0.30	neg		
C101VKC	UFPR	46	F		0.61	neg		
C134EFR	UFPR	56	F		0.35	neg		
C161TBO	UFPR	46	F		0.57	neg	0.16	neg
C287MRP	UFPR	33	F		1.25	neg	1.13	neg
C288DMF	UFPR	35	F		0.95	neg	0.25	neg
C331LAO	UFPR	32	F		3.32	neg	0.80	neg
C369GAC	UFPR	27	M		1.99	neg	0.09	neg
C384NMP	UFPR	63	M		0.35	neg	0.26	neg
C393ARS	UFPR	55	F		1.30	neg	0.09	neg
C409CFJ	UFPR	29	M		12.69	neg	0.00	neg
C410ERA	UFPR	43	M		0.23	neg	0.35	neg
C423AEV	UFPR	21	F		0.81	neg		
C423AEV	UFPR	20	F		-0.13	neg	0.09	neg
C428LTS	UFPR	27	M		2.39	neg	0.16	neg
C430LCP	UFPR	25	F		0.13	neg	-0.09	neg
C434ACB	UFPR	36	F		0.63	neg	0.26	neg
C439FSC	UFPR	21	M		0.25	neg	0.35	neg
C444MEK	UFPR	22	F		1.76	neg		
C449LCS	UFPR	21	F		0.23	neg		
C453CMC	UFPR	30	F		1.80	neg	0.79	neg
C464TDF	UFPR	28	F		0.70	neg	0.08	neg
C465JSJ	UFPR	21	F		0.51	neg		
C469MCM	UFPR	20	F		2.96	neg	4.04	neg
C472EKC	UFPR	29	M		1.40	neg	0.44	neg
C473IRR	UFPR	35	F		0.89	neg	2.38	neg
C474RHE	UFPR	34	M		0.00	neg	0.00	neg
C475VLC	UFPR	59	M		2.11	neg		
C476ICM	UFPR	55	F		0.51	neg	0.35	neg
C477OVO	UFPR	55	M		1.06	neg		
C478ZKA	UFPR	62	M		1.73	neg		
C479JOI	UFPR	30	M		12.90	neg		
C480LCO	UFPR	24	F		2.23	neg		

Controls from endemic areas (CE)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
C630ILB	HAP	74	F		0.38	neg	0.00	neg
C635AAT	HAP	68	M		0.38	neg	0.53	neg
C665HCF	HAP	33	M		4.19	neg	2.64	neg
C688SBA	HAP	43	M		3.52	neg		
C689EGB	HAP	26	M		1.65	neg	0.35	neg
C690AXA	FMRP	51	F		49.37	pos	64.35	pos
C691AXU	HAP	37	F		0.52	neg	0.57	neg
C692LHF	HAP	66	M		1.97	neg	1.21	neg
CP465NGP	HAP	46	M		1.40	neg	1.41	neg

PF patients without lesions and no immunosuppressive treatment (PFSLST)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
P242NRS	HAP	62	F	4	2.81	neg		
P307LRS	HAP	31	F	4	0.93	neg		
P360JIS	HAP	34	M	3	30.46	pos	1.23	neg
P362BCP (feb/14)	HFSU	53	F	NI	186.42	pos	2.73	neg
P376GOC	HFSU	52	F	3	1.90	neg	0.00	neg
P377IYY	HFSU	48	M	NI	3.40	neg		
P378YHP	HFSU	52	M	4	2.30	neg		
P380MQJ (nov/14)	HFSU	17	F	3	116.41	pos	0.48	neg
P387YLU	HFSU	30	M	4	96.47	pos	0.40	neg
P388MCY	HFSU	25	M	4	9.50	neg		
P413YNG	FMRP	19	M	3	0.20	neg		
P416OYX	FMRP	35	F	4	4.90	neg	0.32	neg
P417CQY	FMRP	63	M	4	21.87	pos	20.27	pos

PF patients without lesions and under immunosuppressive treatment (PFSLCT)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
P229MFF	HAP	52	F	NI	188.50	pos	0.40	neg
P266RMS	HAP	29	F	3	195.56	pos	0.18	neg
P352UDS	HAP	14	M	3	206.80	pos		
P356ADV	HC	37	M	3	173.86	pos	1.67	neg
P357MAF (2014)	HC	55	M	3	4.98	neg	0.26	neg
P363KHP (2014)	HFSU	13	F	NI	230.08	pos	0.26	neg
P367ABP	HAP	22	M	3	209.91	pos		
P369JCC	HAP	30	F	3	241.36	pos	1.23	neg
P382SCD	HAP	17	F	3	241.37	pos	0.18	neg
P384APK	HFSU	52	F	3	0.76	neg	7.48	neg
P392KEB	HAP	38	M	3	91.02	pos		
P419MVI	FMRP	24	F	3	228.36	pos	0.08	neg

PF with lesions and not under immunosuppressive treatment (PFCLST)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
P325CEA	HAP	48	M	2	241.05	pos	0.57	neg
P362BCP (nov/14)	HFSU	54	F	2	180.30	pos	6.62	neg
P391XQG	HFSU	15	F	1	264.35	pos	177.22	pos
P414AIK	FMRP	28	F	2	130.91	pos	0.65	neg
PK253EVM	HAP	62	F	2	240.61	pos	2.99	neg

PF patients with lesions and under immunosuppressive treatment (PFCLCT)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
P111JCM	HAP	40	F	2	236.10	pos	1.45	neg
P281FGS	HAP	47	F	2	200.46	pos	3.47	neg
P282NRA	HAP	32	F	2	298.94	pos		
P285JLO	HAP	31	F	2	282.30	pos	0.18	neg
P295EMS	HAP	34	F	2	194.76	pos	1.21	neg
P296ESA	HAP	54	F	2	249.54	pos		
P336ELC	HAP	33	F	2	132.92	pos	0.16	neg
P342GVN	HAP	56	F	1	264.13	pos		
P349CPP	HAP	35	F	2	259.77	pos		
P353JME	HAP	68	M	1	237.06	pos	0.00	neg
P357MAF (2011)	HC	52	M	2	78.00	pos	0.62	neg
P359RSG	HAP	25	F	2	111.57	pos		
P362BCP (may/14)	HFSU	54	F	2	179.57	pos	2.64	neg
P363KHP (2012)	HFSU	12	F	2	227.03	pos	0.26	neg
P364INS	HFSU	18	M	2	292.08	pos		
P366SSP	HAP	40	F	2	175.89	pos	2.46	neg
P368AOS	HAP	38	F	2	2.66	neg	1.50	neg
P370SOC	HAP	48	F	1	133.81	pos		
P371ASS	HAP	42	F	2	46.19	pos	0.26	neg
P372DPB	HAP	15	F	2	225.38	pos		
P373ITS	HAP	44	F	2	152.18	pos		
P374JBS	HAP	60	M	2	298.36	pos		
P375ACR	HAP	22	F	2	229.14	pos		
P379FPS	HFSU	25	F	2	260.94	pos	0.18	neg
P380MQJ (feb/14)	HFSU	16	F	2	165.61	pos	0.26	neg
P381VFS	HFSU	38	M	2	223.21	pos		
P383EYI	HAP	15	F	2	247.41	pos		
P385BXI	HFSU	12	M	2	277.87	pos		
P389DVC	HFSU	17	M	2	194.42	pos	4.36	neg
P390BLW	HFSU	32	F	2	159.11	pos	0.24	neg
P393OKQ	HAP	32	F	2	231.68	pos		
P394XSE	HAP	47	F	2	180.98	pos	2.67	neg
P395KEG	HAP	68	M	2	96.36	pos	1.62	neg
P396NMK	HFSU	31	F	1	239.41	pos	0.40	neg
P397KWV	HFSU	74	M	2	189.57	pos		
P398HKU	HFSU	49	F	2	194.31	pos	1.70	neg
P399LAF	HFSU	33	M	1	256.49	pos	1.62	neg
P407OEV	HAP	32	M	2	181.78	pos	0.73	neg
P408NKP	HFSU	29	M	2	193.74	pos	0.24	neg
P409JGF	HFSU	17	M	2	185.08	pos	0.32	neg
P411WDS	HFSU	32	M	2	240.89	pos	1.62	neg
P412YXZ	HFSU	47	F	2	219.70	pos		
P418KIP	FMRP	33	F	2	0.10	neg		

PV patients presenting lesions and under immunosuppressive treatment (PV)								
ID	Location	Age	Gender	Class	DSG1	DSG1_res	DSG3	DSG3_res
PV004JBA (2011)	HAP	35	F	m	20.71	pos		
PV004JBA (2013)	HAP	37	F	m	5.38	neg		
PV014VLT	HC	58	F	m	2.51	neg	1.37	neg
PV020DSF	HC	42	F	m	1.02	neg		
PV022SCL	HC	64	M	m	46.01	pos	172.21	pos
PV030SMC	HAP	80	F	c	9.85	neg		
PV034MCF	HFSU	80	F	m	2.34	neg		
PV035CGS	HFSU	33	F	mc	149.75	pos		
PV036EAL	HFSU	49	F	mc	3.05	neg		
PV037ASA	HAP	59	F	NI	111.61	pos		
PV038PDK	HAP	62	M	mc	110.66	pos		
PV039WKQ	HFSU	40	F	c	117.16	pos		
PV040EFD	HFSU	29	M	NI	127.92	pos	200.00	pos
PV043EPM	HC	34	M	m	1.90	neg	187.85	pos
PV046VYS	HFSU	48	F	mc	82.77	pos		
PV048CBN	HC	29	M	NI	0.68	neg	13.65	neg
PV049JNI	HC	38	F	m	2.62	neg	4.36	neg
PV056SQL	FMRP	31	F	m	2.73	neg	166.07	pos
PV059VSB	FMRP	45	M	c	2.23	neg	0.24	neg
PV060WQV	FMRP	38	F	c	153.30	pos		
PV061FFA	FMRP	41	F	m	3.86	neg		

When ID is followed by a date, it means more than one sample was available for the patient. PF: pemphigus foliaceus; PV: pemphigus vulgaris; Location: where samples were collected; Class: classification of patients according to severity of lesions, time without new lesions, or type of lesions (m: mucosal only, c: cutaneous only, mc: mucocutaneous); DSG1: levels of anti-DSG1 (U/mL); DSG1_res: interpretation of the levels of anti-DSG1; DSG3: levels of anti-DSG3 (U/mL); DSG3_res: interpretation of the levels of anti-DSG3; HAP: Hospital Adventista do Pênfigo; FMRP: Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; UFPR: Laboratório de Genética Molecular Humana (controls) or Hospital de Clínicas (patients) da Universidade Federal do Paraná; HFSU: Lar da Caridade Hospital do Fogo Selvagem de Uberaba; F: female; M: male; NI: no information; pos: positive; neg: negative.